

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ADN DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS EXPOSTAS A DIFERENTES CONDIÇÕES – ESTUDO COMPARATIVO

VANESSA RAQUEL BRANCO BOGAS
TESE DE DOUTORAMENTO APRESENTADA
À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
CIÊNCIAS FORENSES

Doutoramento em Ciências Forenses

Métodos de extração de ADN de amostras biológicas expostas a diferentes condições – estudo comparativo

Vanessa Raquel Branco Bogas

Orientador: Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Coorientador: Professora Doutora Maria de Fátima Terra Pinheiro – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Porto

2013

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
para candidatura ao grau de Doutor em Ciências Forenses.
Esta investigação foi realizada no Serviço de Genética e Biologia Forense da
Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP.

Constituição do Júri

Nos termos do disposto do n.º 2 do art.º 17.º do Regulamento dos Terceiros Ciclos de Estudos da Universidade do Porto, em seguida descrever-se-á a composição do júri de doutoramento em Ciências Forenses, nomeado por despacho vice-reitoral de 15 de março de 2013.

Presidente: Professor Doutor José Agostinho Marques, Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Vogais: Doutor Duarte Nuno Pessoa Vieira, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

Doutor Francisco Manuel Andrade Corte-Real Gonçalves, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade de Aveiro;

Doutora Ana Mónica de Oliveira e Silva Rodrigues Garcia Ramos de Carvalho, Assessora de Medicina Legal do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.;

Doutora Teresa Maria Salgado de Magalhães, Professora Catedrática Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

Doutora Laura Sofia Mendes Cainé, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Aos meus pais e irmã

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves gostaria de agradecer a oportunidade que me deu de realizar este trabalho no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP.

A todos os meus colegas do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do I.N.M.L., IP. quero agradecer toda a acumulação da atividade laboratorial suportada durante a execução deste trabalho. Um especial agradecimento à Diretora de Serviço, Dra. Maria João Porto e à Dra. Virgínia Lopes por todo o apoio e incentivo prestado.

À Doutora Mónica Carvalho pela sua preciosa ajuda, apoio científico, disponibilidade e inesgotável paciência.

À Professora Doutora Maria de Fátima Pinheiro pelo seu apoio e sugestões relativas à realização do trabalho.

Ao Nelson Cruz, o meu agradecimento especial por toda a atenção, carinho e dedicação prestada ao longo deste trabalho.

Ao Pedro Brito, o meu agradecimento pelo especial contributo na realização deste trabalho, pelo incentivo, apoio, compreensão e amizade.

À Sra. Enfermeira Filomena Mena, pela colaboração na recolha das amostras sanguíneas aos voluntários.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com a sua ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, aos quais dedico este trabalho, sem os quais não teria sido possível a sua realização. A eles devo a força e confiança que em mim depositaram e que procurei sempre merecer.

Índice

Lista de abreviaturas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
1. Introdução	1
1.1. Identificação Genética.....	3
1.1.1. Marcadores genéticos mais usados em Genética Forense.....	3
1.1.1.1. <i>Short Tandem Repeats</i> (STR)	4
1.1.1.2. MiniSTR	7
1.2. Determinação do Perfil Genético	8
1.2.1. Extração de ADN	8
1.2.2. Quantificação do ADN extraído	9
1.2.3. Amplificação de ADN	12
1.2.4. Separação dos fragmentos amplificados	14
1.3. Fatores que interferem com a identificação genética	15
1.3.1. Degradação do ADN.....	15
1.3.1.1. Constituição do solo	15
1.3.1.2. Micro-organismos	16
1.3.2. Inibidores da amplificação de ADN.....	17
1.3.3. Luz ultravioleta (UV)	18
1.3.4. Artefactos da amplificação de ADN	19
1.3.4.1. <i>Stutter</i>	19
1.3.4.2. Picos extra	20
1.3.4.3. Efeito estocástico	20
1.3.4.4. Contaminações.....	21
1.4. <i>Low template DNA</i> (LT-DNA)	22
2. Justificação e objetivos	23
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1. Amostragem	29
3.2. Procedimentos laboratoriais.....	31
3.2.1. Extração de ADN	31
3.2.1.1. Extração orgânica de ADN.....	31
3.2.1.2. Extração de ADN pelo método de <i>Chelex</i> ®.....	32
3.2.1.3. Extração de ADN pelo <i>kit QIAamp DNA Investigator</i> (QIAGEN)	33
3.2.1.4. Extração de ADN pelo <i>kit DNA IQ™ System</i> (Promega)	34
3.2.1.5. Extração automática de ADN pelo <i>Automate Express™ Forensic DNA Extraction System</i> com o <i>kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction</i> (AB).....	35
3.2.2. Purificação do ADN extraído.....	36
3.2.3. Quantificação por PCR em tempo real	37
3.2.4. Amplificação do ADN por PCR	38
3.2.4.1. <i>AmpFℓSTR® Identifier™</i> (AB)	39
3.2.4.2. <i>AmpFℓSTR® Identifier Plus™</i> (AB)	40
3.2.4.3. <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> (AB).....	40
3.2.4.4. <i>AmpFℓSTR® NGM™ SElect</i> (AB)	40
3.2.5. Análise dos produtos amplificados	41

4. Análise e discussão dos resultados	43
4.1. Amostras enterradas em solo pantanoso	45
4.2. Amostras colocadas em solo argiloso	47
4.3. Amostras colocadas em solo arenoso	53
4.4. Amostras colocadas à superfície do solo de um bosque.....	58
4.5. Amostras colocadas num poço	63
4.6. Amostras colocadas dentro de uma habitação	63
4.7. Amostras sujeitas a lavagem com detergente	66
4.8. Amostras sujeitas a lavagem com lixívia	67
4.9. Considerações gerais.....	67
5. Conclusões	71
6. Bibliografia	75
7. Anexos	81
7.1. Anexo I – Tabelas	83
7.2. Anexo II – Figuras	128
7.3. Anexo III – Artigos Publicados	175
7.4. Anexo IV – Artigo aceite para publicação	179

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características de vários STR autossômicos utilizados na identificação genética humana forense	6
Tabela 2 – Características dos fragmentos de miniSTRs e redução do tamanho do fragmento relativamente ao STR	8
Tabela 3 – Número de manchas realizadas para os diferentes indivíduos, tecidos e meios de degradação.....	83
Tabela 4 – Composição química dos diferentes solos.....	31
Tabela 5 - Intervalo de concentrações de ADN da amostra utilizado em cada <i>kit</i> de amplificação	39
Tabela 6 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controlo positivo /referência para os diferentes marcadores com o <i>kit</i> de amplificação <i>AmpFℓSTR® Identifier™</i> / <i>AmpFℓSTR® Identifier™ Plus</i>	85
Tabela 7 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controlo positivo /referência para os diferentes marcadores com o <i>kit</i> de amplificação <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	85
Tabela 8 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controlo positivo /referência para os diferentes marcadores com o <i>kit</i> de amplificação <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	85
Tabela 9 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo pantanoso durante a época de verão a) extraídas pelo <i>kit DNA IQ System</i> , pelo método de <i>Chelex</i> e purificadas com <i>Microcon®</i> e NaOH e pelo <i>kit QIAamp DNA Investigator</i> ; b) extraídas pelo <i>kit Prepfiler Express</i> e c) extraídas pelo método orgânico.....	86
Tabela 10 - Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo pantanoso até 15 dias após a sua colocação (época de verão)	46
Tabela 11 – Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo pantanoso, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os <i>kits AmpFℓSTR® Identifier™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	88
Tabela 12 – Condições de amplificação com o <i>kit AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e aplicação da amostra 137, enterrada em solo pantanoso	47
Tabela 13 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo argiloso durante as épocas de verão e inverno.....	89
Tabela 14 - Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo argiloso até 15 dias durante o inverno (a) e até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (b)	48

Tabela 15 - Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo argiloso durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifier™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	92
Tabela 16 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 64 (verão) e 911 (inverno) enterradas em solo argiloso com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifier™ Plus</i>	50
Tabela 17 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 911 enterrada em solo argiloso com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	50
Tabela 18 - Condições de amplificação com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e aplicação das amostras 360, 533 (verão) e 1077 (inverno) enterradas em solo argiloso	51
Tabela 19 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 54 (verão) e 1058 (inverno) enterradas em solo argiloso com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	52
Tabela 20 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 54 e 1058 enterradas em solo argiloso com o kit <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	52
Tabela 21 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo arenoso durante as épocas de verão e inverno.....	95
Tabela 22 - Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas na Figueira da Foz, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo arenoso até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (a) e até 15 dias durante o inverno (b)	53
Tabela 23 - Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo arenoso durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifier™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	99
Tabela 24 - Condições de amplificação de amostras enterradas em solo arenoso com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifier™</i> e <i>AmpFℓSTR® Identifier™ Plus</i> e sua aplicação.....	55
Tabela 25 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 200 enterrada em solo arenoso com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler</i>	56
Tabela 26 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 904 enterrada em solo arenoso com o kit <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	57
Tabela 27 - Condições de amplificação e aplicação de amostras enterradas em solo arenoso com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	57
Tabela 28 – Resultados de quantificação das amostras colocadas à superfície de um solo de um bosque durante as épocas de verão e inverno	103
Tabela 29 – Variação da temperatura (°C), precipitação (mm) e percentagem de humidade (%) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo arenoso até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (a) e até 30 dias durante o inverno (b)	59

Tabela 30 - Perfis genéticos obtidos das amostras colocadas à superfície do solo de um bosque durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	107
Tabela 31 - Condições de amplificação e aplicação de amostras colocadas à superfície do solo de um bosque com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	61
Tabela 32 - Condições de amplificação e aplicação das amostras colocadas a superfície do solo de um bosque com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	63
Tabela 33 – Resultados de quantificação das amostras colocadas num poço.....	113
Tabela 34 – Resultados de quantificação das amostras colocadas dentro de uma habitação	114
Tabela 35 - Variação da temperatura (°C) e humidade (%) ocorridas dentro da habitação durante 2 anos.	64
Tabela 36 - Perfis genéticos obtidos das amostras colocadas dentro de uma habitação, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	117
Tabela 37 - Condições de amplificação com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i> e aplicação de amostras colocadas dentro de uma habitação	65
Tabela 38 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 183 e 559 colocadas numa habitação com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	65
Tabela 39 – Resultados de quantificação das amostras lavadas com detergente	124
Tabela 40 - Perfis genéticos obtidos das amostras lavadas com detergente, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	125
Tabela 41 - Condições de amplificação com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e aplicação da amostra 1407 lavada com detergente 2ª vez.....	66
Tabela 42 – Resultados de quantificação das amostras lavadas com lixívia.....	127
Tabela 43 - Perfis genéticos obtidos das amostras lavadas com lixívia, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i> , <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i> e <i>AmpFℓSTR® NGM SElect™</i>	127

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da quantificação com <i>Quantifiler™ Human DNA Quantification</i>	10
Figura 2. Gráfico representativo da quantificação por PCR em tempo real	11
Figura 3. Ilustração do resultado da amplificação de um marcador heterozigótico	12
Figura 4. Esquema representativo do ciclo de PCR	13
Figura 5. Esquema representativo da reação de PCR	13
Figura 6. Esquema representativo da eletroforese capilar e detecção dos produtos de amplificação	14
Figura 7. Esquema representativo da formação de produtos <i>stutter</i>	20
Figura 8. Esquema representativo de possíveis resultados de amplificação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN	21
Figura 9. Representação dos diversos locais de degradação: a) Poço, b) Paúl, c) Argila, d) Areal, e) Superfície do solo de um bosque e f) Habitação	29
Figura 10. Representação dos diversos tecidos: a) Ganga, b) Licra, c) Algodão	30
Figura 11. Representação esquemática da extração orgânica	32
Figura 12. Representação esquemática da extração por <i>Chelex</i>	33
Figura 13. Curvas de calibração calculadas com diferentes concentrações de <i>standard</i>	37
Figura 14. Ciclo de PCR do <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i>	39
Figura 15. Ciclo de PCR do <i>AmpFℓSTR® Identifiler Plus™</i>	40
Figura 16. Ciclo de PCR do <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	40
Figura 17. Ciclo de PCR do <i>AmpFℓSTR® NGM™ SElect</i>	41
Figura 18. Fotografia representativa do tecido algodão enterrado em solo pantanoso, ao fim de 1 dia .	46
Figura 19. Perfil genético da amostra 137 extraída com o <i>kit QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o <i>kit AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	128
Figura 20. Fotografia do tecido de algodão do dador Q enterrado em solo argiloso durante 3 meses no período de verão	49
Figura 21. Perfil genético da amostra 64 extraída pelo <i>kit DNA IQ System</i> e amplificada com 10µl de produto extraído com o <i>kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	129

Figura 22. Perfil genético da amostra 911 extraída pelo método de <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	130
Figura 23. Perfil genético da amostra 911 extraída pelo método de <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	131
Figura 24. Perfil genético da amostra 360 extraída pelo kit <i>DNA IQ System</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	132
Figura 25. Perfil genético da amostra 533 extraída pelo kit <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	133
Figura 26. Perfil genético da amostra 1077 extraída pelo kit <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	134
Figura 27. Perfil genético da amostra 54 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>NGM Select</i> ™	135
Figura 28. Perfil genético da amostra 1058 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>NGM Select</i> ™	136
Figura 29. Fotografia do tecido de algodão do dador <u>P</u> enterrado em solo arenoso durante 3 meses no período de verão	54
Figura 30. Perfil genético da amostra 200 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com 2µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	137
Figura 31. Perfil genético da amostra 901 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	138
Figura 32. Perfil genético da amostra 904 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	139
Figura 33. Perfil genético da amostra 977 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	140
Figura 34. Perfil genético da amostra 1031 extraída pelo kit <i>QIAamp DNA Investigator</i> amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	141
Figura 35. Perfil genético da amostra 1033 extraída pelo kit <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	142
Figura 36. Perfil genético da amostra 200 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	143
Figura 37. Perfil genético da amostra 904 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>NGM Select</i> ™	144

Figura 38. Perfil genético da amostra 134 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	145
Figura 39. Perfil genético da amostra 982 extraída por <i>Chelex</i> , purificada com <i>Microcon</i> ® e NaOH e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	146
Figura 40. Perfil genético da amostra 542 extraída por <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	147
Figura 41. Perfil genético da amostra 1028 extraída por <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>MiniFiler</i> ™	148
Figura 42. a) Fotografia do tecido de algodão do dador <u>P</u> colocado à superfície do solo de um bosque durante 3 meses no período de verão b) Fotografia do tecido de licra do dador <u>P</u> colocado à superfície do solo de um bosque durante 30 dias no período de inverno	60
Figura 43. Perfil genético da amostra 410 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	149
Figura 44. Perfil genético da amostra 418 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 10µl com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	150
Figura 45. Perfil genético da amostra 418 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	151
Figura 46. Perfil genético da amostra 973 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 3µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	152
Figura 47. Perfil genético da amostra 973 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 6µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	153
Figura 48. Perfil genético da amostra 416 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	154
Figura 49. Perfil genético da amostra 486 extraída por <i>DNA IQ System</i> , amplificada com 4µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	155
Figura 50. Perfil genético da amostra 612 extraída por <i>QIAamp DNA Investigator</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	156
Figura 51. Perfil genético da amostra 407 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 7µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	157
Figura 52. Perfil genético da amostra 407 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™ <i>Plus</i>	158
Figura 53. Perfil genético da amostra 413 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 1µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR</i> ® <i>Identifiler</i> ™	159

Figura 54. Perfil genético da amostra 413 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 2µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	160
Figura 55. Perfil genético da amostra 420 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 6µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	161
Figura 56. Perfil genético da amostra 699 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	162
Figura 57. Perfil genético da amostra 407 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	163
Figura 58. Perfil genético da amostra 413 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	164
Figura 59. Perfil genético da amostra 420 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	165
Figura 60. Perfil genético da amostra 699 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	166
Figura 61. Fotografias dos tecidos a) ganga e b) algodão, do dador <u>P</u> colocados dentro de um poço durante 1 dia	63
Figura 62. Perfil genético da amostra 155 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 5µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i>	167
Figura 63. Perfil genético da amostra 186 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 5µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i>	168
Figura 64. Perfil genético da amostra 183 extraída por <i>Chelex</i> , amplificada com 5µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™</i>	169
Figura 65. Perfil genético da amostra 559 extraída por <i>DNA IQ System</i> , amplificada com 10µl de produto extraído com o kit <i>AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus</i>	170
Figura 66. Perfil genético da amostra 183 extraída por <i>Chelex</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	171
Figura 67. Perfil genético da amostra 559 extraída por <i>DNA IQ System</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	172
Figura 68. Perfil genético da amostra 1407 extraída com o kit <i>DNA IQ System</i> e amplificada com o kit <i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	173

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNmt - ADN mitocondrial

AB – Applied Biosystems

CHLC - *Cooperative Human Linkage Center*

dNTP - Desoxinucleótidos trifosfatados

DTT – Ditioteitol

HA - Ácido húmico

IPC – Controlo interno da PCR em tempo real

LT-DNA - *Low template DNA*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

STR - *Short Tandem Repeats*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms*

TERTh - Transcriptase reversa da telomerase humana

UV – Ultravioleta

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µM – Micromolar

ml - Mililitro

SGBF-C - Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

VNTR – *Variable number of tandem repeat*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RPM – rotação por minuto

TE – Tris-EDTA

pb - Par de bases

max. – máximo

min. – mínimo

RFU – unidades relativas de fluorescência

Resumo

Os produtos biológicos expostos ao meio ambiente degradam-se, dificultando frequentemente a sua identificação genética. A técnica de extração do ADN mais adequada para o estudo de amostras forenses pode variar consoante o tipo de amostra e o seu estado de conservação o qual depende das condições a que esta esteve sujeita.

Com este trabalho, pretendeu-se comparar a eficiência de diversos métodos de extração de ADN e aperfeiçoar protocolos de extração no estudo de amostras forenses muito degradadas, sujeitas a ambientes hostis e na presença de inibidores.

Foram realizadas manchas de sangue em ganga, licra e algodão, as quais foram sujeitas a condições ambientais semelhantes às das amostras forenses frequentemente encontradas em locais de crime. As manchas foram mantidas em diferentes condições ambientais para a sua degradação - água doce (poço), enterradas em três distintos tipos de solo (arenoso, pantanoso e argiloso), à superfície do solo de um bosque e dentro de uma habitação, em diferentes estações do ano, durante um período máximo de dois anos. Foram ainda realizadas lavagens de manchas de sangue com detergente e lixívia. Foram colhidos periodicamente fragmentos representativos de cada amostra e utilizados diferentes métodos de extração de ADN (*Chelex*[®], *QIAamp*[™] *DNA Investigator*, *DNA IQ*[™] *System*) em relação aos distintos tipos de amostras. Todas as amostras extraídas foram quantificadas com *Quantifiler*[™] *Human DNA Quantification* (AB). As amostras com quantidade de ADN entre 0,01 e 0,09ng/μl foram amplificadas com o *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] (AB) e com quantidade superior a 0,09ng/μl foram amplificadas com o *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler*[™] (AB) ou *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler Plus*[™] (AB). Por fim, os fragmentos amplificados foram separados e detetados nos sequenciadores automáticos 3130 e 3500 *Genetic Analyzers* (AB) e obtidos os respetivos perfis genéticos.

A extração de ADN com o *kit QIAamp DNA Investigator* permitiu recuperar em termos qualitativos uma maior quantidade de ADN na maioria das amostras sujeitas aos diferentes ambientes e condições, quando comparado com os restantes métodos de extração. Para as amostras enterradas em solo arenoso durante 3 meses, na época do verão, a extração com *Chelex* seguida de purificação com *Microcon*[®]/*Amicon*[®] e NaOH, possibilitou a recuperação de quantidade de ADN suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] e, consequentemente, a obtenção de um perfil genético completo. No tecido de algodão, o *kit* de amplificação *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] permitiu a obtenção de perfis genéticos completos de amostras sujeitas a diferentes condições durante períodos mais longos.

O solo pantanoso, o poço e a lavagem com lixívia foram os ambientes que mais rapidamente levaram à degradação do ADN presente nas diferentes amostras, enquanto que a habitação foi o ambiente que permitiu a conservação do ADN durante mais tempo, possibilitando a identificação genética completa da maioria das amostras. O *kit* de extração *QIAamp DNA Investigator* mostrou ser um método de extração de ADN muito versátil e eficaz na remoção de vários tipos de inibidores da PCR, da generalidade das amostras.

Abstract

Biological products exposed to detrimental environmental conditions suffer degradation which difficult its analysis. The most adequate extraction technique for the study of forensic samples may vary depending on the type of sample and the conditions it was subjected.

This work aimed at comparing the efficiency of different DNA extraction methods and improve extraction protocols in the study of very degraded forensic samples subjected to hostile environmental conditions and in the presence of inhibitors.

Bloodstains were made in denim, lycra and cotton and forensic samples identical to those found at crime scenes were simulated. These blood samples were simultaneously subject to several natural degradation processes, the samples were maintained under different environmental conditions - fresh water (well), inside a house, buried in three different types of soil (sand, marsh and clay) and at the soil surface in a forest in different seasons during a maximum period of two years. Washes of the bloodstains with detergent and bleach, were also carried out. Representative fragments of each sample were periodically collected and different DNA extraction methods were applied to extract DNA (*Chelex*[®], *QIAamp DNA Investigator*, *DNA IQ*[™] System). All extracted samples were quantified with *Quantifiler*[™] *Human DNA Quantification* (AB). Samples with an average amount of DNA between 0,01 and 0,09ng/μl were amplified with *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] (AB) and samples with more than 0,09ng/μl were amplified with *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler*[™] (AB) or *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler Plus*[™] (AB). The amplified fragments were then separated in 3130 and 3500 Genetic Analyzers (AB) and the respective genetic profiles obtained.

DNA extraction with *QIAamp DNA Investigator kit* allowed the recovery of a higher quality and quantity of DNA in most samples subjected to the various environments and conditions, as compared with other extraction methods. For the samples buried in sandy soil for 3 months during summer season, the *Chelex* extraction followed by *Microcon*[®]/*Amicon*[®] and NaOH purification, enabled the recovery of enough amount of DNA for amplification with *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] amplification kit and the achievement of a complete genetic profile. The blood samples on cotton fabric and the *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™] amplification kit allowed the obtainment of complete genetic profiles of samples subjected to the various adverse conditions for the longest periods.

The marshy soil, the fresh water (well) and the bleach treatment were the environments that led to a faster degradation of the DNA present in the different samples, while the house environment enabled the preservation of the DNA for longer periods, allowing the obtainment of a complete genetic identification of the majority of the samples. The *QIAamp DNA Investigator extraction kit* showed to be the most versatile extraction method and effective in removing the various types of PCR inhibitors from the generality of the samples.

1.Introdução

Introdução

O estudo e conhecimento do ácido desoxirribonucleico (ADN) têm revelado particularidades com grande aplicabilidade na genética forense.

Desde meados da década de 80 do século XX, que a análise do ADN se tem tornado indispensável na identificação individual em múltiplos casos de investigação criminal ou de identificação de vítimas de acidentes, na avaliação da relação de parentesco entre indivíduos ou na comparação de amostras colhidas em locais de crime e suspeitos, uma vez que o ADN é exclusivo de cada indivíduo, à exceção dos gémeos monozigóticos (Jeffreys et al., 1985).

O primeiro método para a identificação genética individual, conhecido também por *DNA fingerprinting*, foi descrito em 1985 por Alec Jeffreys. Foram denominadas *Variable Number Tandem Repeat* (VNTRs) as determinadas regiões do ADN não codificante que contêm sequências que se repetem sucessivamente e que se encontram organizadas de diferentes formas em indivíduos diferentes. O método de análise utilizado para estudar os VNTRs ficou conhecido por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), tendo sido assim denominado uma vez que recorria ao uso de enzimas de restrição para clivar as regiões de ADN que circundavam as regiões de repetição, cujos resultados se apresentavam na forma de bandas (Jeffreys et al., 1985).

A identificação genética de uma amostra biológica de um indivíduo compreende o estudo de um conjunto de características hereditárias, detetáveis em qualquer amostra biológica do mesmo, as quais são idênticas nos diferentes tecidos. Constituem exceções a esta regra, a presença de quimerismo num indivíduo, o qual se caracteriza por possuir duas ou mais linhagens celulares diferentes, que podem ter sido resultantes de um transplante medular, transfusão sanguínea ou ter sido adquirido durante o desenvolvimento embrionário.

O estudo destas características ou marcadores genéticos compreende a determinação do genótipo, o qual, no caso dos marcadores autossómicos, é constituído normalmente por dois alelos (que podem ser iguais ou diferentes). Cada um destes alelos é herdado de um dos progenitores e transmitido à geração descendente de acordo com as Leis de Mendel. O perfil genético de uma amostra de ADN contempla o conjunto de todos os genótipos de todos os marcadores analisados.

1.1. Identificação Genética

1.1.1. Marcadores genéticos mais usados em Genética Forense

Cerca de 99,7% do genoma humano é igual de indivíduo para indivíduo, sendo apenas uma pequena fração do ADN - 0,3% que permite distinguir cada pessoa.

O ADN nuclear é composto por duas regiões, a região codificante e a região não codificante. A primeira é a que determina a expressão de proteínas, sendo bastante importante na área da clínica médica mas, uma vez que é pouco polimórfica, tem pouca utilidade no âmbito da medicina legal. A segunda, a região não codificante, contém sequências repetitivas de ADN muito polimórficas que são utilizadas para a identificação genética humana.

As sequências repetitivas de ADN têm designações diferentes consoante o número de pares de bases (pb) que as constituem. São denominadas de minissatélites quando compostas por 8 a 100 pb e microssatélites (STRs) quando compostas por 2 a 7 pb (Butler, 2005).

A posição de um gene ou marcador de ADN num cromossoma é designada *locus*. Cada *locus* de cromossomas homólogos caracteriza-se por poder conter formas alternativas de um marcador de ADN, denominadas de alelos. O genótipo de um marcador autossómico é definido pelos alelos presentes num determinado *locus* de cromossomas homólogos, sendo este constituído normalmente por dois alelos. Quando estes dois alelos de um mesmo *locus* são iguais designa-se por homozigótico e quando são diferentes por heterozigótico.

A coexistência de formas distintas de um gene ou de uma sequência de ADN de interesse forense numa população é designada de polimorfismo genético quando a frequência do alelo mais comum de um determinado *locus* existe na população com uma frequência menor do que 99%.

Os polimorfismos de ADN dividem-se em 1) polimorfismos de sequência (ex. SNPs), que resultam da alteração de uma única base nucleotídica e 2) polimorfismos de comprimento (ex. STRs), que se definem como repetições em *tandem*, de uma determinada sequência de nucleótidos, podendo variar no número de repetições. Estes últimos polimorfismos são os mais utilizados na identificação genética individual, uma vez que têm um elevado poder de discriminação individual.

A tipagem do perfil genético de ADN de um indivíduo consiste na determinação do genótipo de vários *loci* de ADN.

Existem vários tipos de marcadores genéticos que podem ser caracterizados no ADN nuclear (podendo ser autossómicos ou sexuais) e no ADN mitocondrial. Os marcadores genéticos autossómicos são individualizantes, uma vez que são específicos de um indivíduo, por sofrerem recombinação, enquanto que os marcadores do cromossoma Y e do ADN mitocondrial são marcadores de linhagem, uma vez que são transmitidos por um dos ascendentes. O ADN mitocondrial é herdado via materna e o cromossoma Y é herdado por via paterna.

1.1.1.1. *Short Tandem Repeats (STR)*

As sequências repetitivas de ADN são denominadas de *Short Tandem Repeats (STR)* quando o tamanho da unidade de repetição varia entre 2 a 7 pb.

As sequências de repetição dos STRs são designadas consoante o tamanho da unidade de repetição. Os STRs dinucleotídicos são constituídos por dois nucleótidos que se repetem sequencialmente; os STRs trinucleotídicos são constituídos por 3 nucleótidos na unidade de repetição. Os STRs constituídos por uma unidade de repetição com 4 nucleótidos são os mais utilizados para a identificação humana, dado que em comparação com os dinucleótidos e os trinucleótidos: a) são mais polimórficos, isto é, têm um maior número de variações alélicas

possíveis; b) sofrem menos produtos *stutter*, que surgem devido a um deslizamento da enzima ADN polimerase durante a amplificação do ADN molde (PCR), resultando normalmente num alelo com menos uma unidade de repetição do que o alelo principal; c) têm capacidade de gerar produtos de PCR de tamanho reduzido, o que permite analisar amostras degradadas (Butler, 2009). A constituição dos STRs, além de variar no tamanho da unidade de repetição e no número de vezes que esta se repete, varia também no padrão da unidade de repetição. Este padrão pode ser **simples**, no qual a unidade de repetição tem sempre a mesma sequência e tamanho (ex. GATA); **composto**, no qual a unidade de repetição contém duas ou mais unidades diferentes de repetição com comprimento variável (ex. CTTT/TTCC) ou **complexo**, que pode conter várias unidades de repetição de comprimento variável (ex. TCTA/TCTG) (Tabela 1).

O número de vezes que a unidade de repetição se repete origina formas alternativas de alelos. Os alelos são representados por números que indicam o número de vezes que uma unidade de repetição completa se repete, ou seja, se uma unidade de repetição se repete 9 vezes, trata-se do alelo 9. Existem também alelos intermédios, que são alelos representados por um número seguido de um ponto decimal e um algarismo. O algarismo que se segue ao ponto representa o número de nucleótidos presentes numa unidade de repetição incompleta (exemplo - alelo 9.3 no marcador TH01; a unidade de repetição de 4 nucleótidos está repetida 9 vezes seguida de uma unidade de repetição incompleta com apenas 3 desses 4 nucleótidos).

O estudo de STRs tem múltiplas vantagens, nomeadamente: 1) exige pequenas quantidades de ADN (0,1 – 1ng); 2) tem um elevado poder discriminatório entre indivíduos; 3) tem baixa taxa de mutação; 4) apresenta resultados de fácil interpretação e comparação (Gill P Fau - Fereday et al., 2006, Pinheiro, 2008).

Tabela 1 - Características de vários STRs autossômicos utilizados na identificação genética humana forense.

Locus	Posição no cromossoma	Unidade de repetição	Intervalo de alelos	Referência
D8S1179	Cromossoma 8 (125.976 Mb)	Composta TCTA/TCTG	7 – 20	C.H.L.C. GATA7G07.37564 (C.H.L.C.)
D21S11	Cromossoma 21 (19.476 Mb)	Complexa TCTA/TCTG	12 – 41.2	(Sharma and Litt, 1992)
D7S820	Cromossoma 7 (83.433 Mb)	Simples GATA	5 – 16	C.H.L.C. GATA3F01.511 (C.H.L.C.)
CSF1PO	Cromossoma 5 (149.436 Mb)	Simples TAGA	5 – 16	(Hammond et al., 1994)
D3S1358	Cromossoma 3 (45.557 Mb)	Composta TCTG/TCTA	8 – 21	(Li et al., 1993)
TH01	Cromossoma 11 (2.149 Mb)	Simples TCAT	3 – 14	(Polymeropoulos et al., 1991)
D13S317	Cromossoma 13 (81.620 Mb)	Simples TATC	5 – 16	C.H.L.C. GATA7G10.415 (Center)(Center)(Center)(C.H.L.C.)(C.H.L.C.)(C.H.L.C.)
D16S539	Cromossoma 16 (84.944 Mb)	Simples GATA	5 – 16	C.H.L.C. GATA11C06.715 (C.H.L.C.)
D2S1338	Cromossoma 2 (218.705 Mb)	Composta TGCC/TTCC	15 – 28	C.H.L.C. GGAA3A09.31762 (C.H.L.C.)
D19S433	Cromossoma 19 (35.109 Mb)	Composta AAGG/TAGG	9 – 17.2	C.H.L.C. GCAA2A03.135 (C.H.L.C.)
vWA	Cromossoma 12 (5.963 Mb)	Composta TCTG/TCTA	10 – 25	(Kimpton et al., 1992)
TPOX	Cromossoma 2 (1.472 Mb)	Simples GAAT	4 – 16	(Anker et al., 1992)
D18S51	Cromossoma 18 (59.100 Mb)	Simples AGAA	7 – 40	(Straub et al., 1993)
D5S818	Cromossoma 5 (123.139 Mb)	Simples AGAT	7 – 18	C.H.L.C. GATA3F03.512 (C.H.L.C.)
FGA	Cromossoma 4 (155.866 Mb)	Composta CTTT/TTCC	12.2 – 51.2	(Mills et al., 1992)
D10S1248	Cromossoma 10 (131.093 Mb)	Simples GGAA	7 – 19	C.H.L.C. G00-366-431 (C.H.L.C.)
D22S1045	Cromossoma 22 (37.536 Mb)	Simples ATT	7 – 20	C.H.L.C. ATA37D06.40596 (C.H.L.C.)
D2S441	Cromossoma 2 (68.239 Mb)	Composta TCTA/TCAA	8 – 17	C.H.L.C. GATA8F03.505 (C.H.L.C.)
D1S1656	Cromossoma 1 (230.905 Mb)	Composta TAGA	8 – 20.3	C.H.L.C. GATA44E05.40831 (C.H.L.C.)
D12S391	Cromossoma 12 (12.450 Mb)	Composta AGAT/AGAC	13 – 27.2	C.H.L.C. GATA11H08.731 (C.H.L.C.)
SE33	Cromossoma 6 (89.043 Mb)	Simples AAAG	4.2 – 37	(Polymeropoulos et al., 1992)

Adaptada de Butler 2005

Os quatro marcadores com maior tamanho do produto de PCR são o CSF1PO, D2S1338, D18S51 e o FGA enquanto o D8S1179, D3S1358, D19S433 são os *loci* com tamanho mais reduzido. Os três marcadores mais polimórficos são FGA (80 alelos possíveis), D18S51 (51 alelos possíveis) e D21S11 (82 alelos possíveis), enquanto o TPOX mostra ser o menos polimórfico (apenas 15 alelos possíveis) (Butler, 2009).

1.1.1.2. MiniSTR

A amplificação de amostras degradadas ou com inibidores podem originar a obtenção de um perfil genético parcial ou inexistente. Normalmente, são os marcadores de maior tamanho (ex. D18S51 e FGA) os primeiros a não amplificar com sucesso.

De forma a ultrapassar os efeitos da degradação e inibição, o tamanho dos fragmentos dos STRs produzidos durante a PCR foi reduzido através da aproximação do local de ligação dos *primers* ao marcador. Estes marcadores foram designados por miniSTRs (Butler et al., 2003).

A amplificação de STRs é normalmente realizada com recurso a *primers* que são complementares a uma região com uma determinada distância ao início e final do marcador enquanto que a amplificação de miniSTRs recorre a *primers* que são complementares a uma região mais próxima do início e fim do marcador, reduzindo o tamanho dos produtos de PCR entre 25 a 299 pares de bases (pb) relativamente ao seu tamanho original (**Tabela 2**).

A maior desvantagem da análise de miniSTRs reflete-se na amplificação de um número mais reduzido de marcadores genéticos em simultâneo, devido à proximidade de tamanho dos diferentes produtos de PCR, em geral entre 70 pb e 283 pb (Butler, 2009).

Amostras muito degradadas ou com um número reduzido de moléculas de ADN presentes, ao serem amplificadas usando miniSTRs podem originar perfis completos, enquanto que, com uma amplificação de STRs o perfil poderá ser parcial ou até mesmo não apresentar qualquer resultado. Uma amostra degradada, com inibidores ou com quantidade exígua de material genético, pode também sofrer a não amplificação de um alelo de um marcador quando amplificada para STRs, podendo induzir em erro caso o marcador seja heterozigótico, dando origem a um falso homozigótico. A amplificação de miniSTRs nesta amostra reduz a probabilidade de perda alélica (Butler et al., 2003).

Em amostras degradadas, o sucesso da amplificação de um marcador é inversamente proporcional ao tamanho do mesmo, isto é, quanto maior for o *locus* a amplificar, menor é a taxa de sucesso da mesma. Os *loci* com fragmentos maiores, como o D18S51, FGA e CSF1PO são os primeiros a sofrer perda alélica, na amplificação de amostras muito degradadas (Alaeddini et al., 2010).

Tabela 2 - Características dos fragmentos de miniSTRs e redução do tamanho do fragmento relativamente ao STR.

Locus	Tamanho do fragmento miniSTR (pb)	Intervalo de alelos	Redução de tamanho (pb)
TH01	51 – 98	3-14	-105
TPOX	65-101	5-14	-148
CSF1PO	89-129	6-16	-191
vWA	88-148	10-15	-64
D8S1179	125-281	12.2-51.2	-71
D21S11	153-211	24-38.2	-33
D3S1358	72-120	8-20	-25
D13S317	88-132	5-16	-105
D16S539	81-121	5-15	-152
D18S51	113-193	7-27	-151
D2S1338	90-142	15-28	-198
FGA	125-281	12.2-51.2	-71
D7S820	136-176	5-15	-117
D5S818	81-117	7-16	-53

Adaptada de Butler (2005)

1.2. Determinação do Perfil Genético

Para a análise de uma amostra biológica são necessários vários procedimentos até à obtenção do seu perfil genético. Esta análise inicia-se com a extração do ADN da amostra, na qual ocorre a libertação das moléculas de ADN das células. De seguida, procede-se à quantificação do ADN, amplificação da região de interesse que permite o aumento do número de moléculas de ADN e a posterior determinação, por eletroforese, do genótipo para os marcadores genéticos analisados que constituem o respetivo perfil genético (Willard et al., 1998).

1.2.1. Extração de ADN

A **extração** é a primeira fase na análise de uma amostra biológica. O procedimento mais adequado a adotar no isolamento e extração do ADN de amostras forenses varia consoante o tipo de amostra biológica, o suporte onde se encontra e as condições a que esteve sujeita. A morosidade das técnicas, a incapacidade de remoção de inibidores, assim como os inúmeros passos e as múltiplas transferências de tubos, propícia o aumento da possibilidade de

contaminação por ADN exógeno e a perda de material, constituindo limitações dos diversos protocolos de extração desenvolvidos pela comunidade forense.

A extração orgânica (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) foi, durante muitos anos, a técnica de eleição. Este método é eficiente na remoção de inibidores mas menos eficaz em termos de quantidade de ADN extraído/recuperado. Uma outra técnica, baseada no uso de uma resina quelante de catiões, o *Chelex*, permite obter uma quantidade razoável de ADN, de um modo simples, rápido, económico e sem recurso a reagentes tóxicos. Porém é menos eficaz no que respeita à remoção de vários inibidores (Walsh et al., 1991, Lahiri et al., 1992, Greenspoon et al., 1998, Bar et al., 1988).

O processo de extração é o passo mais crítico na análise de uma amostra forense. É durante esta fase que se isolam as moléculas de ADN de todos os restantes componentes das células, como proteínas e outros materiais celulares, assim como dos inibidores presentes na amostra. O processo de extração divide-se geralmente em três fases: 1) lise celular, libertando o ADN para o meio; 2) separação do ADN dos restantes componentes celulares e 3) isolamento do ADN para posterior amplificação. Este processo deve ser eficaz a fornecer uma solução estável de ADN de elevada qualidade, de modo a poder ser analisado (Butler, 2005).

Um bom procedimento de extração de ADN não deve pressupor o uso de produtos tóxicos e deve permitir a obtenção rápida e económica de elevada quantidade de ADN purificado, a partir de diversos tipos de amostras. Não existe, no entanto, nenhum protocolo de extração de ADN que preencha todos estes requisitos.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos *kits* comerciais para a extração de ADN de amostras forenses. Estes *kits* são baseados na extração de ADN com recurso a uma fase sólida, que permite a sua purificação. Pode recorrer-se a uma coluna ou a partículas magnéticas às quais se liga o ADN por alteração do pH do meio, permitindo a eliminação de inibidores. Estes *kits* comercializados por diferentes casas comerciais têm inúmeras vantagens relativamente aos métodos mais tradicionais. São *kits* que concentram e purificam uma amostra de ADN, removendo grande parte dos inibidores mais comuns, permitindo a obtenção de um perfil genético completo com uma menor quantidade de amostra. Outra vantagem reside na possibilidade de conservação do produto extraído durante mais tempo, uma vez que as nucleases e os cofatores (p.ex. iões metálicos) necessários à sua ação são removidos durante o processo de extração do ADN. As maiores desvantagens são o reduzido volume final de produto extraído, a morosidade da técnica e o elevado custo por amostra.

1.2.2. Quantificação do ADN extraído

A quantidade e qualidade de ADN extraído devem ser determinadas antes de se proceder à sua amplificação, de modo a obter-se um perfil genético completo.

Existem diversas metodologias que permitem quantificar ADN, nomeadamente a espectrofotometria, fluorometria, PCR em tempo real, no entanto, poucos são os métodos específicos para ADN humano.

A **quantificação** por PCR em tempo real permite avaliar a qualidade e quantidade do ADN extraído amplificável, isto é, determinar a quantidade de moléculas de ADN molde que se

encontram intactas, permitindo a ligação dos *primers* e consequentemente a sua amplificação (Swango et al., 2006).

Uma das técnicas utilizadas na PCR em tempo real baseia-se na química *TaqMan*® que recorre à amplificação de uma sequência específica do ADN com *primers* específicos e uma sonda marcada. Como exemplo da aplicação desta química, no *Quantifiler™ Human DNA Quantification* (AB), a sequência amplificada encontra-se no gene da transcriptase reversa da telomerase humana (TERTh) que se localiza na região não codificante do cromossoma 5 e tem 62 pares de bases de comprimento. A sonda tem um fluorocromo numa das extremidades e um *quencher* (molécula que absorve a energia emitida pelo fluorocromo) na outra. Enquanto a sonda se mantiver intacta em solução ou acoplada à região alvo, o *quencher* encontra-se próximo do fluorocromo. Assim, a energia do fluorocromo excitado é transferida para o *quencher*, impedindo a emissão de fluorescência. Na presença de ADN amplificável, a sonda hibridiza a sequência complementar do ADN alvo, localizada entre as regiões de acoplamento dos *primers*, e, na presença de *Taq* ADN Polimerase o ADN é amplificado (**Figura 1**). A *Taq* ADN Polimerase, além de atividade de polimerase, tem igualmente atividade de exonuclease. Durante a polimerização, a enzima degrada a sonda e promove o afastamento entre o *quencher* e o fluorocromo, permitindo que este emita fluorescência ao ser excitado por um laser. A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de ADN presente na amostra.

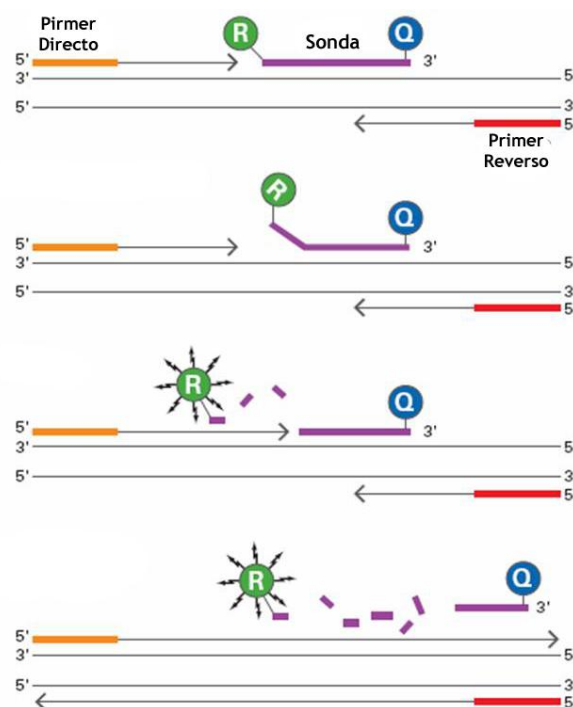


Figura 1. Esquema representativo da quantificação com *Quantifiler™ Human DNA Quantification*. (Asuragen, 2010)

A fluorescência é detetada e medida por um sistema ótico, sendo analisado por um *software* específico. A fluorescência produzida à medida que o produto é amplificado é registada (**Figura 2**).

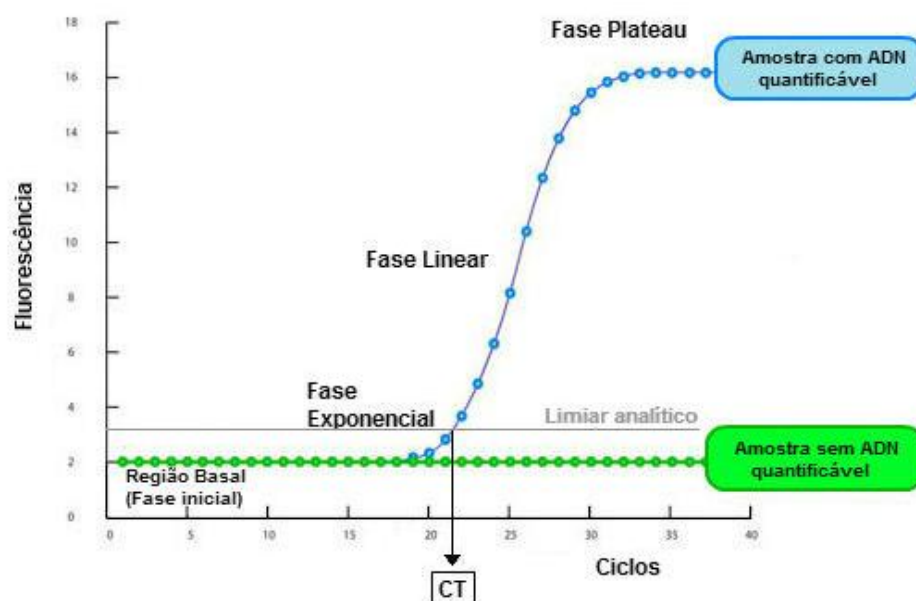


Figura 2. Gráfico representativo da quantificação por PCR em tempo real, que tem como variáveis, a fluorescência e o número de ciclos, que permite monitorizar em tempo real, a eficiência da reação de amplificação (Abbott, 2010).

A **fase inicial** da PCR em tempo real representa os ciclos iniciais de amplificação que são caracterizados por pequenos aumentos do sinal de fluorescência. Assim que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limite de deteção, inicia-se a **fase exponencial**. O ponto CT (*cycle threshold*) indica o número de ciclos a partir do qual a fluorescência atinge o valor definido como limiar analítico (*threshold*). É neste momento que o produto amplificado é quantificado. A **fase linear** é a fase em que a amplificação diminui ligeiramente devido à diminuição da concentração de um ou mais componentes necessários à PCR. A fase final da amplificação é a **fase de plateau**, onde não há acumulação de mais produtos, atingindo-se o fim da otimização da técnica (Butler, 2012).

A quantificação do produto amplificado é realizada através da comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade do sinal de fluorescência gerado durante os ciclos de amplificação, com concentrações conhecidas de uma sequência idêntica à que se pretende quantificar.

A presença de um controlo interno da PCR (IPC) permite verificar a eficiência: da Taq DNA Polimerase; da química dos diferentes componentes da mistura; do funcionamento correto do instrumento; e verificar a presença de inibidores co-extraídos durante a extração.

A PCR em tempo real apresenta inúmeras vantagens relativamente a outras técnicas de quantificação, porém tem algumas desvantagens. Como vantagens destacam-se a amplificação e quantificação: 1) de pequenas quantidades de ADN; 2) de ADN degradado em pequenos fragmentos com apenas algumas centenas de pares de bases (pb); 3) específica para ADN humano, não amplificando nem quantificando ADN de fungos e bactérias. Referem-se como desvantagens a não amplificação/quantificação do ADN alvo: 1) na presença de inibidores da

PCR; 2) devido a uma alteração na região de ligação dos *primers* da PCR no ADN alvo; 3) na presença de ADN muito degradado ou em quantidade insuficiente (Swango et al., 2006).

A determinação da quantidade de ADN numa amostra é essencial, uma vez que a amplificação do ADN necessita de uma quantidade ótima de ADN para se obter um perfil genético completo. A amplificação com quantidade de ADN elevada origina alelos partidos e difíceis de interpretar (**Figura 3a**) e amostras com um número reduzido de moléculas de ADN (*Low template ADN* - **LT-DNA**) origina o desaparecimento de alelos (alelo *drop-out*), isto é, alelos que não amplificaram devido a efeitos estocásticos (**Figura 3b**).

Se a amostra não contiver a quantidade de ADN ideal (**Figura 3c**) para a amplificação, esta quantidade deve ser ajustada, antes de ser amplificada. Caso a amostra tenha quantidade superior à necessária então a amostra deverá ser diluída; caso a amostra tenha quantidade de ADN inferior à ideal, quando possível, deverá ser concentrada.

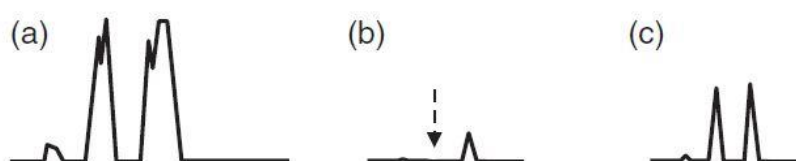


Figura 3. Ilustração do resultado da amplificação de um marcador heterozigótico, na presença de: **a)** amostra com muito ADN; **b)** amostra com pouco ADN; **c)** amostra com quantidade de ADN ideal. Adaptada de Butler (2005)

1.2.3. Amplificação de ADN

A reação de **amplificação** em cadeia pela Polimerase (**PCR – Polymerase Chain Reaction**) é um processo enzimático no qual uma região específica do ADN (sequência repetitiva de ADN) é replicada inúmeras vezes dando origem a várias cópias dessa região.

O processo de amplificação envolve ciclos de aquecimento e arrefecimento, durante os quais uma cópia dessa região é duplicada. Estes ciclos pressupõem: 1) uma fase de aumento de temperatura até $\pm 94^{\circ}\text{C}$ que permite a separação das duas cadeias de ADN molde, fase de **desnaturação**; 2) o arrefecimento até aos $\pm 60^{\circ}\text{C}$ para os *primers* se ligarem às cadeias molde, etapa de **annealing** e 3) um novo aquecimento até $\pm 72^{\circ}\text{C}$ para que a Taq polimerase adicione desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) aos *primers* promovendo a extensão da cadeia de ADN – fase da **extensão** (**Figuras 4 e 5**) (Butler, 2005).

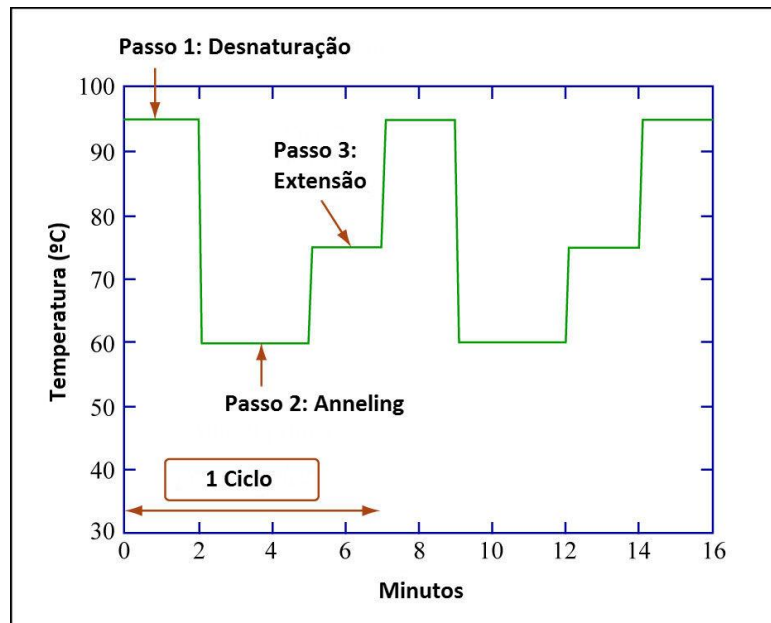


Figura 4. Esquema representativo do ciclo de PCR (Livermore, 2009).

A reação de PCR envolve 1) um conjunto de *primers* (sequências de ADN que reconhecem a zona a amplificar (região alvo)) que são complementares ao ADN molde e que hibridizam antes e depois dessa região; 2) o ADN molde que se pretende amplificar; 3) desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); 4) magnésio para ativar a ADN polimerase; 5) Taq polimerase, enzima responsável pela adição de nucleótidos. A reação da PCR pode ser feita para uma só região alvo ou para várias regiões alvo simultaneamente, designando-se por reação de PCR em multiplex.

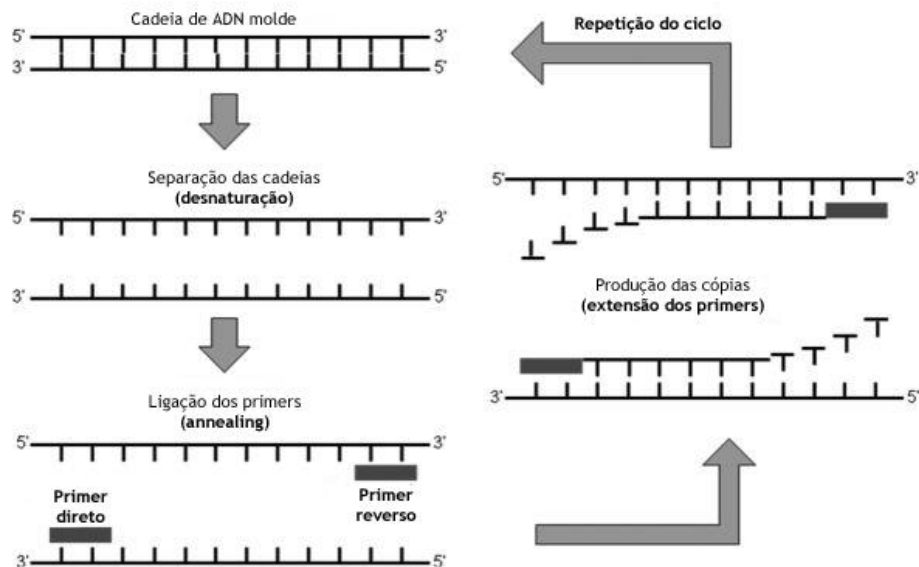


Figura 5. Esquema representativo da reação de PCR (Hashiyada, 2011).

1.2.4. Separação dos fragmentos amplificados

Os STRs resultantes da amplificação são separados pelo tamanho, por eletroforese capilar, sob ação de um campo elétrico, num sequenciador automático. Os grupos fosfato do ADN que estão carregados negativamente numa solução tampão migram em direção ao polo positivo (ânodo). Quanto maior for o campo elétrico maior é a força sentida pelas moléculas de ADN e mais rapidamente ocorre a separação dos fragmentos. Os fragmentos mais pequenos são os primeiros a migrar e a serem detetados (**Figura 6**).

Os fluorocromos dos *primers* utilizados na amplificação são excitados por um laser e um detetor de fluorescência quantifica o sinal captado. Através de um *software* apropriado e por comparação com um *standard* interno (conjunto de fragmentos de ADN, com número de pares de bases conhecido e marcados com um fluorocromo), o sinal é “convertido” em número de pares de bases, que, por sua vez, é comparado com um *LADDER* alélico (mistura artificial de alelos comuns presentes na população humana para os diferentes STRs), atribuindo assim os respetivos alelos a cada marcador.

Os resultados obtidos constituem o perfil genético da amostra que se define como sendo o conjunto de características hereditárias de um indivíduo para um determinado número de marcadores genéticos que pode ser detetada em qualquer amostra biológica desse mesmo indivíduo.

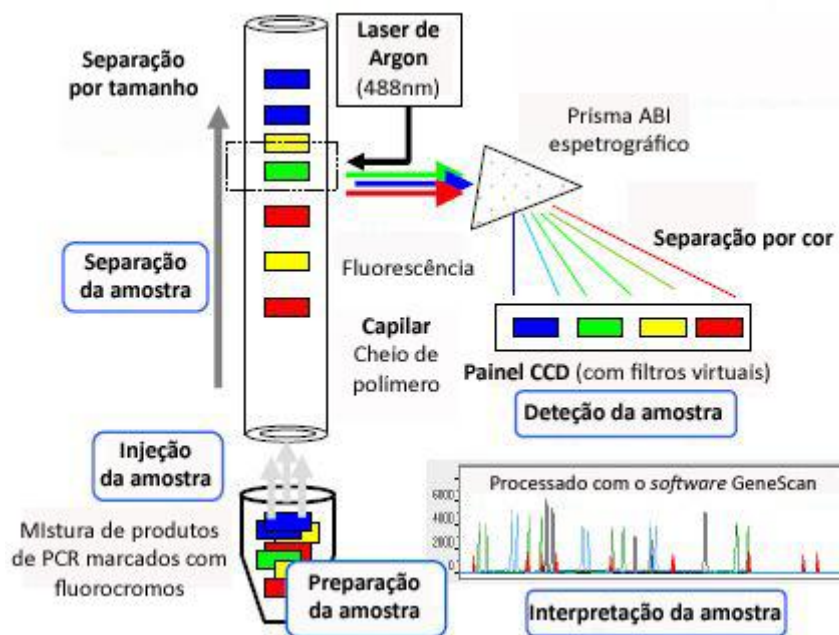


Figura 6. Esquema representativo da eletroforese capilar e detecção dos produtos de amplificação. Adaptado de Butler (2012)

1.3. Fatores que interferem com a identificação genética

Fatores como a degradação e a quantidade de ADN, bem como a presença de inibidores, comprometem a amplificação dos marcadores genéticos da amostra forense e, conseqüentemente, a obtenção do respetivo perfil genético completo.

1.3.1. Degradação do ADN

O ADN quando exposto ao meio ambiente sofre degradação. Esta degradação resulta de processos químicos e/ou enzimáticos (Lindahl, 1993) e depende de fatores como a humidade, variação de temperatura, constituição do solo e principalmente da presença de micro-organismos. A molécula de ADN sofre clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas das bases nucleotídicas e dano oxidativo, resultando na sua fragmentação. Caso esta ocorra na zona de ligação dos *primers*, a amplificação de um ou mais marcadores não ocorre, dificultando a obtenção do perfil genético e deste modo a identificação genética da amostra.

A degradação de uma amostra é facilmente identificada pela diminuição da altura (RFU – unidades relativas de fluorescência) dos alelos à medida que se aumenta o tamanho dos marcadores ao longo de um eletroferograma, podendo chegar mesmo a não haver amplificação dos alelos destes marcadores.

1.3.1.1. Constituição do solo

As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, são fatores que influenciam de modo distinto a degradação do ADN.

O solo é constituído por minerais, matéria orgânica, água, micro-organismos e outros organismos vivos. Diferentes percentagens dos componentes minerais e orgânicos originam distintos tipos de solo que são classificados essencialmente consoante o conteúdo em argila, areia e silte (Matos Fernandes, 2006, Gusmão Filho, 2002).

Um **solo argiloso** é composto por partículas de tamanho entre 0,002 e 0,005mm. É um solo com elevada capacidade de aglutinação, muito compacto, viscoso, pouco arejado, que armazena muita água. Caracteriza-se por ser pouco permeável com excesso de carga elétrica negativa, o que permite reter catiões sendo, por isso, constituído por uma quantidade razoável de óxidos de alumínio, magnésio, ferro e sílica (Matos Fernandes, 2006, Gusmão Filho, 2002).

Um **solo arenoso** é constituído por partículas de tamanho muito variado entre 0,05 e 2mm. É um solo pouco compacto, os grãos de areia não têm coesão, é muito arejado, muito permeável e com baixa capacidade de retenção de água (Matos Fernandes, 2006, Gusmão Filho, 2002).

Um **solo siltoso** tem partículas de tamanho entre 0,005 e 0,05mm. É um solo pouco coeso com características entre o solo argiloso e o arenoso (Matos Fernandes, 2006, Gusmão Filho, 2002).

O ADN nuclear ao ser libertado para o meio envolvente, neste caso o solo, após autólise membranar das células pode: 1) ligar-se a minerais (areia e argila), a substâncias húmicas ou a

complexos organominerais; 2) ser degradado por DNases microbianas e usado como nutriente para o crescimento de plantas e micro-organismos; 3) ser incorporado no genoma bacteriano. A ligação aos minerais depende do pH do solo, que influencia a protonação do ADN. Em solos com pH superior a 5, o ADN encontra-se carregado negativamente, atraindo a ligação de catiões presentes. Estes catiões parecem ser os responsáveis por facilitarem a ligação do ADN a partículas do solo como minerais de argila e ácidos húmicos, igualmente carregadas negativamente (Levy-Booth et al., 2007, Romanowski et al., 1991). A pH inferior a 3, o ADN encontra-se protonado e mais moléculas de ADN se encontram ligadas aos ácidos húmicos, não necessitando da presença de catiões para promoverem esta ligação (Greaves and Wilson, 1969). Deste modo, infere-se que à medida que o pH aumenta, aumenta também a repulsão eletrostática entre o ADN e os minerais do solo, sendo por isso necessário a presença de catiões para promoverem a ligação (Romanowski et al., 1991, Lorenz and Wackernagel, 1987).

A variação na composição do solo e o pH do mesmo são fatores importantes na persistência do ADN neste ambiente, isto é, diferentes composições do solo irão influenciar de modo diferente a degradação do ADN.

A ligação do ADN a partículas minerais, como os minerais de areia ou argila, substâncias húmicas (ácidos húmicos) e complexos organominerais, aumentam a resistência do ADN à degradação por nucleases dos micro-organismos (Lorenz and Wackernagel, 1987, Blum et al., 1997, Levy-Booth et al., 2007). A matriz do solo pode proteger o ADN por: 1) ligação ao ADN protegendo-o diretamente da ação enzimática das nucleases, ou 2) ligação a DNases e nucleases, reduzindo assim o seu potencial enzimático.

A presença de minerais como o magnésio, manganésio, o zinco (Jiang et al., 2008) e o cálcio (Jiang et al., 2008) são fatores determinantes na degradação do ADN, uma vez que são cofatores das nucleases, as quais sem a presença destes não se encontram ativas (Melgar et al., 1968).

1.3.1.2. Micro-organismos

De entre os vários micro-organismos existentes, as bactérias e os fungos são os principais responsáveis pela degradação do ADN. No caso das bactérias, estas podem ser: **aeróbicas**, as quais necessitam de oxigénio para o seu crescimento e metabolismo (sendo mais frequentes em locais com boa oxigenação); **microaeróbicas** que se desenvolvem na presença de uma quantidade restrita e específica de oxigénio; **anaeróbicas obrigatórias**, as quais na presença de oxigénio não sobrevivem; **anaeróbicas facultativas** as quais podem ou não utilizar o oxigénio para o seu metabolismo; **anaeróbicas aerotolerantes**, que toleram a presença de oxigénio mas não o utilizam no seu metabolismo. Para os fungos, a classificação utilizada restringe-se a aeróbicos ou anaeróbicos (Lengeler et al., 2009, John B. Sullivan and Krieger, 2001).

O solo é considerado um reservatório de diversidade genética microbiana. Pensa-se que uma grama de solo conterá cerca de 10 biliões de micro-organismos e possivelmente mais de 1000 espécies diferentes. Diferentes tipos de solo contêm diferentes espécies de micro-organismos que influenciam de modo diferente a degradação do ADN, podendo em alguns ser mais acelerada do que noutros. Em solos com boa oxigenação e boa drenagem como é o caso do solo arenoso são mais frequentes as bactérias e fungos aeróbicos; nos solos compactos,

como são exemplos os solos argilosos e pantanosos, predominam os micro-organismos anaeróbicos (John B. Sullivan and Krieger, 2001).

O carbono e o azoto são os nutrientes necessários ao desenvolvimento dos micro-organismos. Solos arenosos, que são menos ricos nestes nutrientes, contêm uma menor quantidade de micro-organismos do que os solos mais ricos nestes nutrientes, como é o caso dos solos pantanosos e argilosos (Lakay et al., 2007, Zhou et al., 1996, John B. Sullivan and Krieger, 2001).

Em relação aos micro-organismos noutros ambientes, destacam-se as bactérias e fungos aeróbicos, como os principais responsáveis pela degradação do ADN.

A proliferação de micro-organismos está diretamente relacionada com a percentagem de humidade e variação da temperatura, que podem acelerar ou retardar a multiplicação dos mesmos e consequentemente aumentar ou diminuir a taxa de degradação do ADN. Quanto maior for a temperatura e humidade, maior é a taxa de degradação, uma vez que estes fatores promovem a proliferação microbiana, levando ao aumento do número de DNases, que consequentemente degradam o ADN (Blum et al., 1997).

As DNases (ex. nucleases) libertadas pelos micro-organismos são o principal mecanismo responsável pela promoção da degradação de ADN extracelular, atuando sobre o ADN. São enzimas dependentes de cofatores como os iões divalentes cálcio, magnésio ou manganésio. As DNases reconhecem a ligação fosfodiéster no ADN, hidrolisam-na, e levam à formação de oligonucleótidos com cerca de 400pb, podendo posteriormente clivá-los em mononucleótidos (Levy-Booth et al., 2007, Eun, 1996).

1.3.2. Inibidores da amplificação de ADN

A presença de **inibidores** da PCR é um outro fator que dificulta a análise de amostras biológicas, influenciando particularmente amostras degradadas ou com baixa quantidade de ADN. Um conjunto vasto de inibidores interfere com o estudo do ADN, sendo os que mais afetam a identificação forense, os seguintes: 1) os ácidos húmicos que são componentes do solo e se encontram normalmente em amostras que estiveram enterradas; 2) a hematina que se encontra nos glóbulos vermelhos e é constituída por ferro; 3) o *índigo*, que é uma tinta têxtil utilizada em certos tipos de tecido e que pode ser encontrada em produto de ADN extraído de manchas de ganga ou de outros tecidos com cor.

Estes inibidores podem interferir com a amplificação de diversas formas: 1) ligando-se aos nucleótidos impedindo a replicação do ADN molde; 2) ligando-se ao ADN molde (ex. ácido húmicos) ou 3) inibindo a ação da ADN polimerase (enzima necessária à síntese de ADN durante o processo da PCR) por ligação de inibidores ao local de ação da polimerase (ex. *índigo*, hematina) (Opel et al., 2010).

Para ultrapassar a presença de inibidores existem diversas soluções; a) diluição da amostra, que irá igualmente diluir a presença do inibidor; b) adição de uma maior quantidade de ADN polimerase, uma parte da polimerase irá ligar-se aos inibidores e outra irá atuar amplificando o ADN molde; c) adição de albumina do soro bovino (BSA) que minimiza a ação dos inibidores (Kreader, 1996, Comey et al., 1994); d) tratamento da amostra extraída com hidróxido de sódio que se liga ao inibidor inibindo a sua atuação sobre a polimerase (Bourke et al., 1999); e) purificação da amostra extraída em colunas com membranas porosas, por

exemplo *Microcon*® e *Amicon*®, que podem ter tamanhos variados, separando pela diferença de tamanhos, o ADN dos inibidores (Comey et al., 1994); f) extração com *kits* baseados em fase sólida, que permitem extrair ADN livre de inibidores.

1.3.3. Luz ultravioleta (UV)

A luz solar é composta por radiação eletromagnética que se divide em três tipos de radiação classificadas consoante o comprimento de onda: ultravioleta (UV) que varia entre os 200 nanómetros (nm) e os 400nm, visível que varia entre os 400nm e os 700nm e infravermelha que se encontra a partir dos 700nm (Giacomoni, 2007).

A luz UV subdivide-se em UVC (200-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm), variando o comprimento de onda de forma inversamente proporcional à energia transportada. Uma vez que os efeitos xenotóxicos da radiação UV dependem do seu comprimento de onda, o UVC é mais nocivo do que o UVB e este, é consequentemente mais nocivo do que o UVA (Giacomoni, 2007, Vincent T DeVita et al., 2008).

Os comprimentos de onda correspondentes a UVC e UVB são os que são preferencialmente absorvidos pelos nucleótidos (260nm e 280nm). Os comprimentos de onda UVB e UVA não são totalmente filtrados pela camada do ozono, atingindo por isso a superfície terrestre, ao contrário dos comprimentos de onda dos UVC. Assim sendo, o UVB é o mais responsável pelas alterações estruturais verificadas no ADN (Vincent T DeVita et al., 2008). Estas alterações incluem: dano oxidativo, desnaturação, alterações nas bases nucleotídicas, destruição dos açúcares, formação de dímeros intra e intercadeias, entre outras (Hall and Ballantyne, 2004, Sinha and Hader, 2002).

As alterações que ocorrem no ADN dependem também da composição do mesmo: por exemplo, a citosina absorve preferencialmente comprimentos de onda UV maiores do que a timina, assim dímeros de citosina serão preferencialmente formados na presença de UVB (Vincent T DeVita et al., 2008).

Uma das modificações mais comuns que dificulta a identificação genética de uma amostra biológica é a formação de dímeros de timina adjacentes (intercadeia). Esta alteração impede que a ADN polimerase se ligue ao ADN *template* durante a fase de *annealing* da PCR e o amplifique (Cone and Fairfax, 1993).

Num perfil genético de uma amostra biológica sujeita a radiação UV, os primeiros marcadores a apresentarem alterações são os de maior tamanho, que são os primeiros a sofrerem amplificação preferencial do alelo mais pequeno, em detrimento do maior, num mesmo marcador. À medida que o ADN vai sofrendo alterações, outros marcadores vão sendo sucessivamente afetados até não haver amplificação de qualquer marcador.

1.3.4. Artefactos da amplificação de ADN

São vários os artefactos que podem dificultar a análise de um perfil genético de uma amostra com quantidade exígua de ADN. Essa dificuldade pode ser acrescida quando a amostra se encontra degradada ou na presença de inibidores. Estes artefactos podem estar relacionados com a) as metodologias e/ou equipamentos utilizados ou b) com a própria amostra.

Ao recorrer a técnicas que permitam aumentar a sensibilidade de deteção de amostras biológicas com quantidade exígua de ADN, além de se aumentar a probabilidade da obtenção de um perfil genético completo, aumenta-se igualmente a possibilidade do aparecimento de artefactos que dificultam a interpretação do perfil genético obtido (Gill et al., 2000).

Por exemplo, quando se trata de produtos *stutter*, estamos perante um artefacto relacionado com a própria amostra, com o *primer* utilizado ou com as condições da PCR utilizadas para a amplificação. No caso de picos extra que se encontrem fora do *ladder*, estes podem ser resultantes de uma deficiente calibração espectral ou estarem relacionados com os fluorocromos utilizados na amplificação.

1.3.4.1. *Stutter*

Designa-se por *stutter* ao artefacto que resulta de um deslizamento da ADN polimerase durante a fase de amplificação do ADN (**Figura 7a**), podendo promover a inserção (**Figura 7b**) ou deleção (**Figura 7c**) de uma unidade de repetição em alelos de um ou mais marcadores, resultando em cópias incompletas desses alelos. A cadeia molde forma um *loop* e a polimerase ao sintetizar a nova cadeia, leva, geralmente, à perda de uma unidade de repetição resultando num alelo com menos uma unidade de repetição do que o alelo principal, tendo normalmente um tamanho inferior a 15% do tamanho do alelo principal. Este artefacto dificulta a análise dos eletroferogramas de amostras amplificadas com um número de ciclos da PCR superior ao normal, uma vez que origina picos com um tamanho superior a 15% do tamanho (RFU) do alelo real, podendo ser confundidos com alelos.

O número de *stutters* aumenta com o aumento do número de ciclos da PCR assim como com o aumento da quantidade de ADN molde durante a amplificação (Gill et al., 2000).

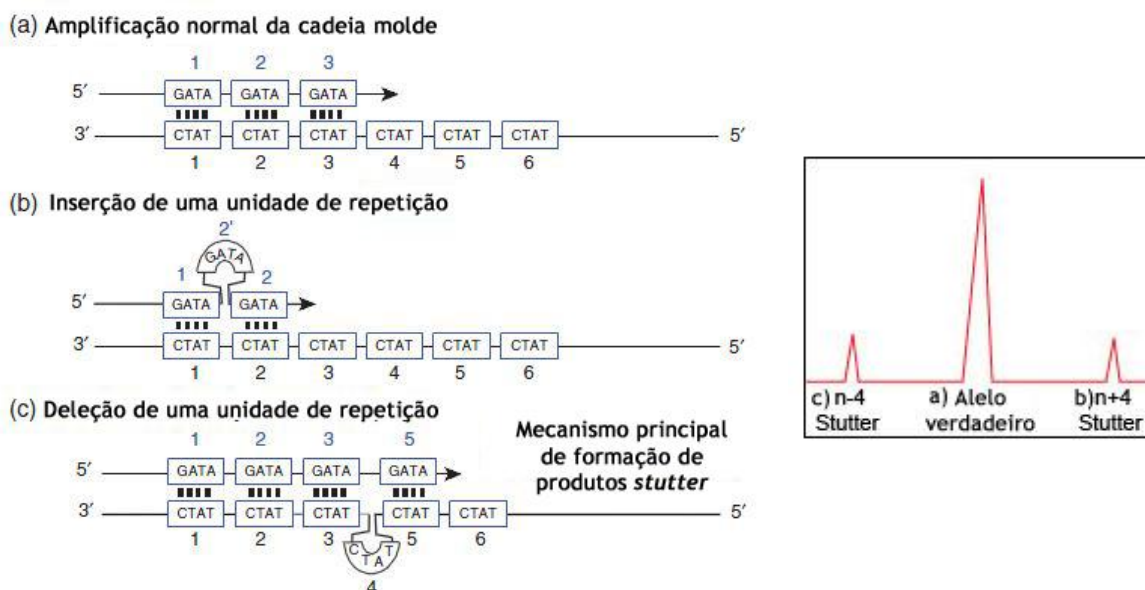


Figura 7. Esquema representativo da formação de produtos *stutter*. (O'Reilly, 2008, Butler, 2012)

1.3.4.2. Picos extra

Os picos de passagem de cor (*pull up*) podem resultar de uma deficiente calibração espectral ou incapacidade do *software* do sequenciador automático filtrar determinada cor (comprimento de onda) por excesso de fluorocromos, principalmente quando a quantidade de ADN amplificado de um ou mais alelos de um ou mais marcadores é muito elevada (Butler, 2009).

Picos de corrente elétrica podem originar falsos picos num eletroforegrama. Estes picos são diferentes de um alelo verdadeiro, uma vez que são mais estreitos e pontiagudos e normalmente aparecem na mesma posição e com igual intensidade nas “diferentes cores” (Butler, 2009).

Os picos resultantes de fluorocromos que se desligaram dos correspondentes *primers* são mais facilmente visíveis no controlo negativo da PCR (Butler et al., 2003, Gill et al., 2000).

Material contaminante de uma amostra de ADN que emita fluorescência entre 500 e 600nm (alguns antibióticos, vitaminas, tintas para têxteis) pode ser detetado no eletroforegrama. Os picos produzidos são normalmente facilmente distinguidos dos picos produzidos por fluorocromos dos *primers* da PCR, uma vez que saem fora do espectro analisado (normalmente entre os 100nm e os 450nm) (Butler, 2009).

1.3.4.3. Efeito estocástico

Em amostras biológicas com baixa quantidade de ADN pode ocorrer amplificação desigual dos dois alelos do mesmo marcador (ficando os alelos desequilibrados), ou até mesmo ocorrer o desaparecimento de um dos alelos – alelo *drop-out*; a este efeito chama-se **efeito estocástico**. Este fenómeno deve-se ao facto de a amostra conter poucas moléculas de

ADN necessárias para serem hibridizadas pelos *primers* e iniciarem a reação de PCR, sendo um dos alelos preferencialmente amplificado em detrimento do outro durante os primeiros ciclos da PCR, observando-se um dos alelos com tamanho (RFU) superior a 60% do outro (**Figura 8**).

Quando ocorre o fenômeno de alelo *drop-out*, pode levar à interpretação de que uma amostra heterozigótica para um marcador seja considerada erradamente homozigótica (Gill et al., 2000, Butler, 2012).

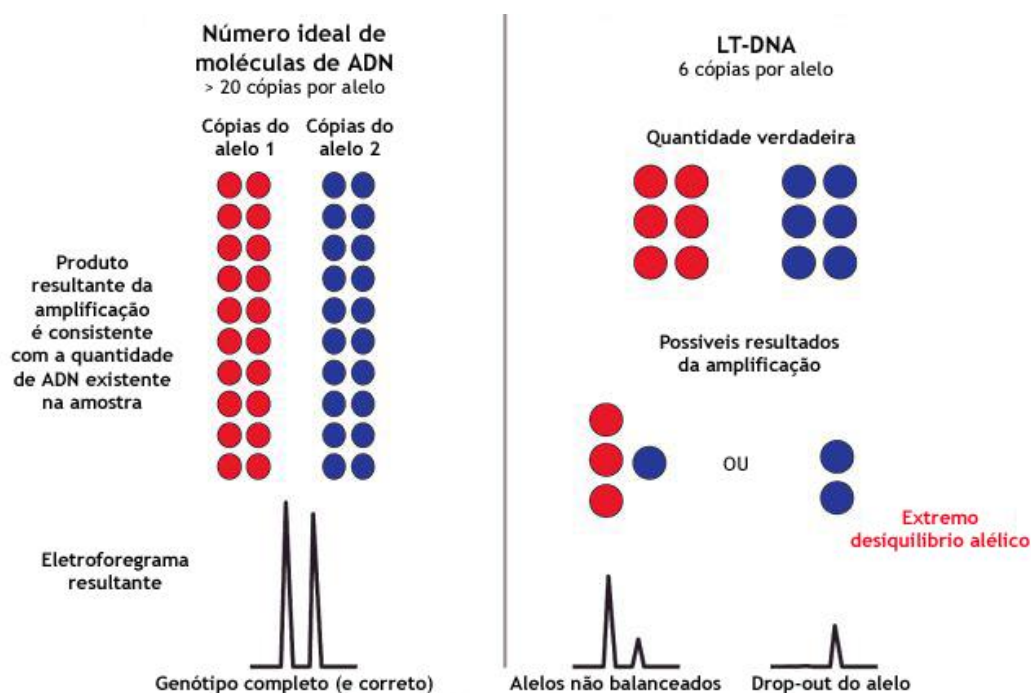


Figura 8. Esquema representativo de possíveis resultados de amplificação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN. Adaptada de Butler (2012)

1.3.4.4. Contaminações

A contaminação de uma amostra biológica consiste na deposição accidental de ADN exógeno numa fase posterior à da sua produção. A probabilidade de detecção de ADN contaminante numa amostra com quantidade reduzida de ADN é maior do que no caso de uma amostra com bastante material. Esta detecção está diretamente relacionada com as proporções das diferentes fontes de ADN exógenas, fazendo com que determinadas contaminações sejam mais facilmente detetáveis do que outras. Se duas fontes de ADN estiverem presentes em proporções diferentes é mais fácil detetar e separar cada uma destas fontes.

A contaminação de uma amostra de ADN colhida num local de crime pode ocorrer em diversas etapas do processo de investigação, isto é, durante a análise do local de crime pelos responsáveis da investigação, durante o acondicionamento, transporte e armazenamento da amostra ou, posteriormente, durante a análise da própria amostra. Os responsáveis pela análise laboratorial podem contaminá-la inadvertidamente: com o seu próprio material biológico; com outra amostra que se encontre simultaneamente em processamento ou por

outra já processada. Pode haver ainda contaminação ambiental no laboratório ou no local de crime e contaminação pelo material descartável utilizado no processamento das amostras (Gill and Kirkham, 2004).

O crescente desenvolvimento das metodologias de análise de amostras com baixa quantidade de ADN tem levado ao aumento da sensibilidade de amplificação e deteção de quantidade exígua de ADN.

A metodologia preferencialmente adotada pela comunidade forense é a que utiliza o aumento de ciclos da PCR (Findlay et al., 1997) que potencia a amplificação de ADN contaminante. Contudo, existem várias outras metodologias possíveis, como o *nested-PCR* (Strom and Rechitsky, 1998), a redução do volume da PCR e o aumento do tempo de injeção no capilar durante a análise no sequenciador (Budowle, 2001).

Amostras criminais com quantidade exígua de ADN que originam perfis genéticos parciais são mais difíceis de interpretar quando têm associada uma ou mais fontes de ADN exógeno. O aparecimento de alelos extra resultantes de contaminações esporádicas é designado por alelo *drop-in*. Este fenómeno não é reprodutível e é mais facilmente detetado quando a mesma amostra é amplificada mais do que uma vez. Quanto mais marcadores forem analisados e quanto maior for a incidência de marcadores heterozigóticos, mais fácil se torna detetar a presença de ADN exógeno contaminante (Gill and Kirkham, 2004).

Marcadores mais polimórficos permitem detetar mais facilmente os diferentes componentes de contaminação numa mistura (Butler, 2009).

Existem várias recomendações para minimizar o risco de contaminações durante a manipulação das amostras, como é o caso da utilização de máscara, luvas e se possível, de batas descartáveis; a utilização de luz UV; a limitação do acesso ao local de análise e manipulação das amostras; a utilização material estéril e descartável e a utilização de controlos negativos (Gill and Kirkham, 2004).

1.4. *Low template DNA* (LT-DNA)

Amostras biológicas com quantidade de material genético inferior a 100pg de ADN, são também conhecidas por *Low template DNA* (LT-DNA) (Gill et al., 2000).

Como já foi referido anteriormente, são diversos os fatores que podem contribuir para esta condição, não excluindo a possibilidade de a amostra depositada num local de crime já ser reduzida. A análise deste tipo de amostras requer um tratamento diferente relativamente a amostras com maior quantidade de ADN, podendo haver a necessidade de utilizar metodologias mais sensíveis, designadamente o aumento do número de ciclos da PCR, entre outras já referidas anteriormente (Gill et al., 2000). No entanto, poderá apresentar como desvantagem o aparecimento de inúmeros artefactos que dificultam essa análise, como: *alelo drop-out*; *alelo drop-in*; aumento de produtos *stutter* e alelos heterozigóticos não balanceados.

2. Justificação e objetivos

Justificação e objetivos

A identificação genética de amostras biológicas em diferentes suportes com quantidade exígua de ADN, muitas vezes sujeitas a condições adversas, incluindo a presença de inibidores, é um contínuo desafio. São diversas as condições adversas a que uma amostra pode ser sujeita. A luz ultravioleta, o calor, a degradação microbiana, são os fatores que mais interferem com a integridade do ADN e dificultam a análise de uma amostra biológica.

O tipo de amostra biológica e o seu estado de conservação são fatores a ter em conta aquando da escolha do método de extração de ADN a utilizar. Apesar de existirem vários métodos para a extração de ADN, muitos apresentam limitações importantes como a morosidade da técnica, a incapacidade de remoção eficiente de inibidores da PCR, os inúmeros passos e as múltiplas transferências de tubos que aumentam a possibilidade de contaminação por ADN exógeno e de perda de ADN. A preocupação em encontrar-se um método de extração que permita recuperar ADN de qualidade para a sua identificação genética é uma constante. Diariamente surgem metodologias de extração cada vez mais eficazes na sua função. A escolha dos métodos de extração deste trabalho teve como base as técnicas mais utilizadas no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (SGBF-C) e na prática da genética forense. A extração orgânica com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, apesar de ter sido durante muitos anos a técnica de extração de referência na área forense, não foi selecionada para este trabalho, uma vez que foi testada em algumas amostras que estiveram enterradas em solo pantanoso e não proporcionou resultados satisfatórios quando comparada com outros métodos escolhidos. O método de extração com a resina quelante *Chelex* foi selecionado por se tratar da metodologia mais utilizada na rotina laboratorial, por ser rápida e com menos custos. O *kit* de extração *DNA IQ System* (Promega) foi escolhido por recorrer a partículas magnéticas, uma tecnologia de extração relativamente recente. O *kit* de extração *QIAamp DNA Investigator* (QIAGEN) foi selecionado por se tratar de um método alternativo que se baseia na adsorção seletiva do ADN a partículas de sílica que estão presentes sob a forma de membranas em colunas, sendo que os contaminantes são retirados ao passar através dessa membrana. Este *kit* proporcionou os melhores resultados durante uma primeira fase de seleção dos métodos de extração.

De entre os vários marcadores genéticos possíveis de serem estudados, os STRs autossómicos foram os escolhidos por: tratar-se de marcadores muito abundantes no genoma humano; necessitarem de uma reduzida quantidade de ADN para se obter um perfil genético completo; serem altamente polimórficos, possibilitando por isso um elevado poder de discriminação entre indivíduos e, principalmente, por serem os marcadores genéticos mais usados em genética forense.

Para a realização deste estudo foram escolhidos 3 tecidos diferentes, a ganga, a licra e o algodão, uma vez que são os tecidos que mais frequentemente aparecem em casos de perícia criminal no SGBF-C. Após a realização de manchas de sangue nos diferentes suportes, estes foram colocados em diferentes locais terrestres e aquáticos (enterradas em solo argiloso, arenoso e pantanoso, colocadas à superfície do solo de um bosque, dentro de uma habitação, num poço) com o intuito de promover a degradação do ADN das amostras biológicas. Algumas manchas foram ainda sujeitas a lavagens com detergente e lixívia. Estes ambientes foram escolhidos tendo em conta os diversos locais de crime onde frequentemente são encontradas amostras biológicas.

A produção de um “stock” de amostras sujeitas a condições idênticas às encontradas em casos de criminalística, possibilita a otimização de protocolos já existentes e uma orientação na metodologia a seguir na presença de amostras limite. A experiência ganha com este trabalho ajuda ainda na interpretação de resultados obtidos em casos de perícia criminal.

Objetivo Geral

Comparar a eficiência de diversos métodos de extração de ADN e aperfeiçoar protocolos de extração já existentes para que melhor se adaptem a amostras forenses muito degradadas, sujeitas a ambientes hostis e na presença de inibidores.

Objetivos Específicos

1. Estudar o padrão de degradação do ADN de amostras biológicas (sangue) consoante o material de suporte, ambiente e tempo de exposição.
 - 1.1. Determinar qual o material de suporte (ganga, licra e algodão) que proporciona melhores resultados na determinação de um perfil genético completo;
 - 1.2. Determinar qual o ambiente que propicia uma maior degradação do ADN ao longo do tempo e qual o que melhor conserva o ADN (solos argiloso, arenoso e pantanoso; habitação; superfície do solo de um bosque; poço e lavagem com detergente ou lixívia).
2. Sistematização do método de estudo mais indicado, a cada ambiente, possibilitando a redução do esforço humano, tempo e custos, bem como a obtenção de ADN analisável em situações limite que de outro modo não revelem material genético para identificação.
 - 2.1. Determinar qual o método de extração de ADN mais eficaz (*QIAamp DNA Investigator* (QIAGEN), *DNA IQ System* (Promega) ou *Chelex*) para cada um dos suportes e ambientes a que as amostras estiveram sujeitas (solos argiloso, arenoso e pantanoso; habitação; superfície do solo de um bosque; poço e lavagem com detergente ou lixívia);
 - 2.2. Otimizar protocolos de extração e purificação, de modo a aumentar a rentabilidade dos procedimentos no sentido de se obter uma maior quantidade de ADN e grau de pureza.

3. Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

O material biológico utilizado neste trabalho foi sangue, colhido a três indivíduos do sexo masculino, não aparentados, o qual foi colocado em 3 diferentes tecidos, ganga, licra e algodão, previamente lavados e descontaminados durante 20 minutos à luz UV.

Foi colhido um volume de 48ml de sangue a cada indivíduo, após consentimento informado, a partir do qual se efetuaram 1602 manchas com 30µl de sangue cada uma (com 50mm² de área), perfazendo uma totalidade de 4806 manchas, para os 3 indivíduos (**Tabela 3 – Anexo I**). Foram efetuadas manchas para a realização de colheitas até 12 meses para os solos pantanoso (só verão), argiloso e arenoso (verão e inverno). Para a superfície do solo de um bosque foram realizadas manchas para a colheita até 24 meses (verão e inverno). Para a habitação e poço foram efetuadas manchas para a colheita até 24 meses. Para as lavagens com detergente e com lixívia foram realizadas manchas para 2 lavagens.

As manchas de sangue foram secas durante 3 dias à temperatura ambiente, antes de serem enterradas em solo argiloso, arenoso e pantanoso, colocadas à superfície do solo de um bosque, dentro de uma habitação, num poço (**Figura 9**). As manchas que foram sujeitas a agentes de limpeza (detergente e lixívia), estiveram durante 2 meses à temperatura ambiente até serem lavadas.

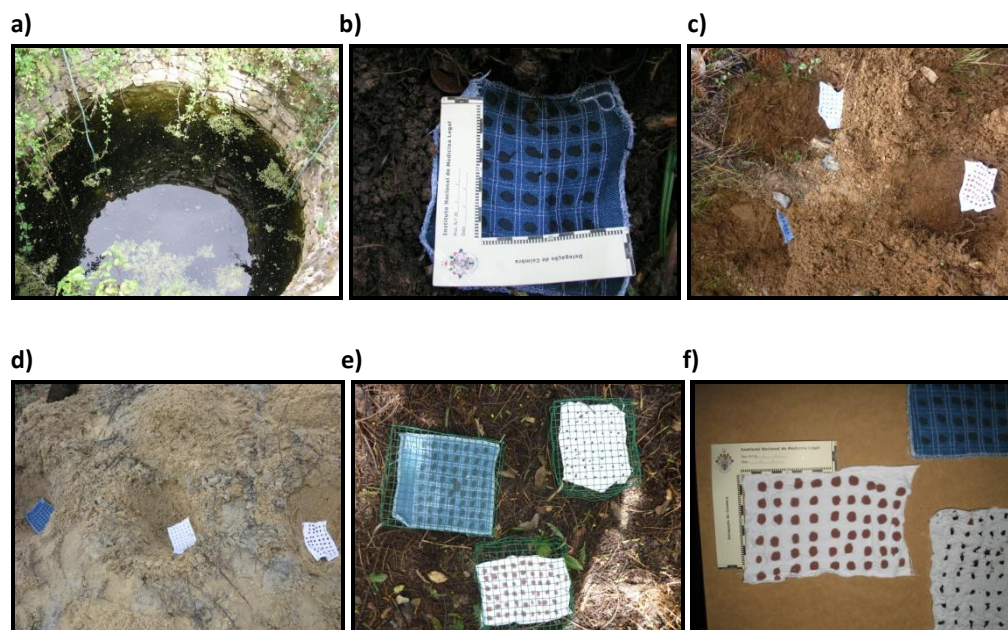


Figura 9. Representação dos diversos locais de degradação: **a)** Poço, **b)** Paúl, **c)** Argila, **d)** Areal, **e)** Superfície do solo de um bosque e **f)** Habitação.

Os vários tecidos foram cortados em formato de retângulo com tamanhos de cerca de 15x13cm. As iniciais dos dadores foram cosidas num dos cantos do tecido assim como linhas horizontais e verticais ao longo do mesmo, originando quadrados orientadores, com cerca de 1cm², no centro dos quais foram colocados os 30µl de sangue (**Figura 10**).

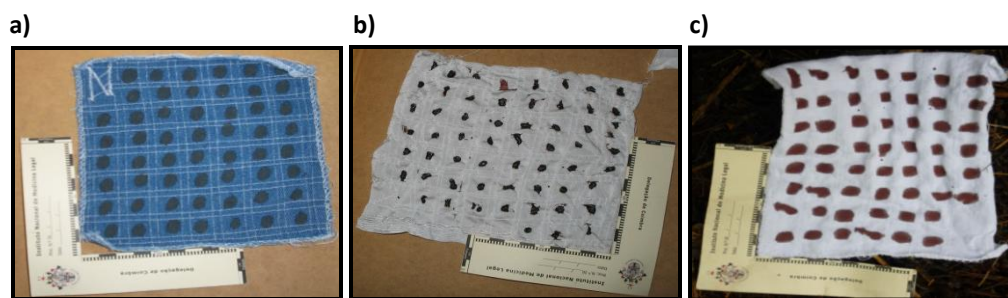


Figura 10. Representação dos diversos tecidos: **a)** Ganga, **b)** Licra, **c)** Algodão.

O tecido ganga é constituído por 97% algodão e 3% *sepanlex* e corado com *índigo* azul; o tecido algodão é constituído por 100% algodão sem qualquer corante; e o tecido licra é constituído por 100% de poliéster sem qualquer tipo de corante.

O sangue nos tecidos ganga e algodão adsorveu bem às fibras dos mesmos. No caso da licra, o sangue secou à superfície do tecido, formando crostas.

A degradação das amostras foi efetuada mediante a sua manutenção em diferentes condições ambientais - água doce (poço), dentro de uma habitação, enterradas em três distintos tipos de solo (arenoso, pantanoso e argiloso) e à superfície do solo de um bosque, durante um período máximo de dois anos.

As manchas enterradas nos solos argiloso e arenoso, assim como as colocadas à superfície do solo de um bosque, que correspondem a um total de 54 retalhos de tecido (2700 manchas), foram divididos em dois lotes de 27 tecidos. A instalação de cada lote foi iniciada em duas épocas diferentes – verão (colocadas a 30 de Junho de 2009) e inverno (colocadas a 6 de Março de 2010), em Coimbra - Casal da Misarela (solo argiloso e superfície do solo de um bosque) - N40°13'13,2"W008°22'09,6" e Figueira da Foz – Dunas de Quiaios (solo arenoso inserido num pinhal) - N40°15'25,8"W008°50'23,7". As amostras enterradas no solo pantanoso - Paúl de Arzila (Coimbra) – N40°10'48,1"W008°33'22,6", foram só colocadas no verão, uma vez que no inverno o solo se encontrava alagado.

Em relação às amostras colocadas em ambientes terrestres, foram colhidas 6 manchas ao fim de 1 dia, 3 dias, 7 dias, 15 dias, 1 mês, 3, 6 e 12 meses, excetuando-se as amostras colocadas dentro de uma habitação em que foram igualmente colhidas ao fim de 24 meses. As colheitas foram efetuadas até aos 12 meses, para a maioria dos ambientes terrestres, por um lado por se desconhecer quais os resultados que viriam a ser obtidos e por outro, para a elaboração de um “stock” de amostras degradadas.

No momento da colheita registou-se o dia e hora, local, temperatura e humidade. Foram igualmente obtidos os registos fotográficos dos locais e manchas, bem como os registos gráficos das estações meteorológicas mais próximas, de temperatura, pressão, humidade e pluviosidade, adquiridos mensalmente, através do *site* www.meteo.pt.

Em relação às amostras colocadas num poço, foram colhidas, igualmente, 6 manchas ao fim de 1 dia, 3, 7, 15 e 30 dias (não foram colhidas amostras após este período, dado que os resultados obtidos não o justificavam, o mesmo se aplica para a criação de um “stock” de

amostras para este ambiente). No momento da colheita, registou-se o dia e hora, local, temperatura e profundidade da água.

Algumas manchas foram ainda sujeitas a lavagens com detergente (marca SKIP) e lixívia, para simular amostras intencionalmente sujeitas a uma variedade de agentes de limpeza, com o intuito de remover o material biológico. As lavagens na máquina foram realizadas a 30°C e tiveram a duração de 1 hora e 30 minutos. De igual forma, foram recolhidas, após cada lavagem, 6 manchas de cada uma destas amostras.

Foram ainda utilizadas algumas das 486 manchas de sangue como controlo para a obtenção dos perfis genéticos de referência para cada tecido e de cada um dos 3 indivíduos.

As manchas colhidas nos diversos ambientes foram secas à temperatura ambiente antes de serem devidamente acondicionadas e congeladas a -80°C, até à sua posterior análise. As amostras controlo foram acondicionadas à temperatura ambiente até ao momento da sua análise.

A habitação utilizada neste trabalho é uma construção em cimento e tijolo. As amostras foram colocadas na cave da mesma e a temperatura e a humidade monitorizadas.

Os solos foram caracterizados quimicamente (pelo Centro de Geociências da Universidade de Coimbra) e as suas características estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Composição química dos diferentes solos.

Solo	SiO ₂ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	CaO (%)	MgO (%)	Na ₂ O (%)	K ₂ O (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	P ₂ O ₅ (%)	TiO ₃ (%)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (Ppm)	pH
Pantoso	55,14	17,56	4,12	2,57	1,07	1,63	3,53	0,65	0,80	978	27,1	160	5,91
Arenoso	68,32	8,66	7,51	1,05	0,89	1,12	1,24	0,09	1,23	234	12,6	71	6,84
Argiloso	54,63	20,31	2,13	1,54	0,84	1,72	4,96	0,56	0,78	563	32,1	97	5,80

3.2. Procedimentos laboratoriais

3.2.1. Extração de ADN

3.2.1.1. Extração orgânica de ADN

Esta técnica foi durante muitos anos utilizada como sendo o método de extração de amostras forenses de eleição, no entanto é uma técnica demorada, envolve a utilização de produtos tóxicos e como é um método que envolve muitos passos de transferências entre tubos, aumenta a probabilidade de erro ou contaminação (Hoff-Olsen et al., 1999).

A extração iniciou-se com uma fase de lise celular na qual se utilizou um detergente o dodecil sulfato de sódio (SDS) e a proteinase K¹. Seguiu-se a adição de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico destinada a promover a desnaturação e a separação das proteínas do ADN, uma vez que este é mais solúvel na solução aquosa desta mistura. Procedeu-se depois a um passo de centrifugação, responsável pela separação entre a fase aquosa (onde se encontra o ADN) e as proteínas e os restos celulares (Gill et al., 1985) (**Figura 11**). Por fim, procedeu-se à purificação da amostra por adição de etanol, o qual promoveu a precipitação do ADN e a remoção de inibidores.

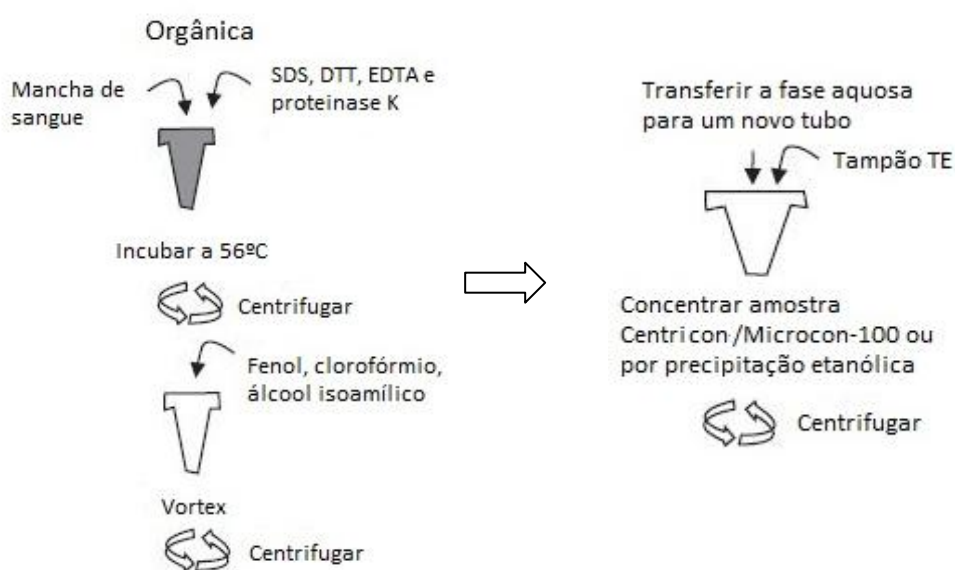


Figura 11. Representação esquemática da extração orgânica. Adaptada de Butler (2005)

3.2.1.2. Extração de ADN pelo método de *Chelex*®

A extração de ADN pelo método de *Chelex*® realizou-se conforme o protocolo descrito por Walsh *et al.* (1991). O *Chelex*® é uma resina quelante composta por copolímeros de estireno divinilbenzeno contendo iões iminodiacetato emparelhados, que se liga a iões metálicos polivalentes, como é o caso do magnésio. Estes iões são necessários à ação de nucleases, que degradam o ADN. Deste modo, estas enzimas ficam inativas e consequentemente as moléculas de ADN são preservadas.

Este método permite obter uma quantidade razoável de ADN, de um modo simples, rápido e económico. No entanto é pouco eficaz no que respeita à remoção de inibidores da PCR.

O ADN obtido no final do protocolo de extração encontra-se desnaturado e em cadeia simples.

¹ Proteinase K – é uma protease que tem a função de promover a rotura da parede celular assim como quebrar as ligações com as proteínas que protegem as moléculas de ADN, libertando-o para o meio. Degrada igualmente nucleases que estejam presentes protegendo o ADN de posterior degradação.

O protocolo compreendeu as seguintes etapas (**Figura 12**):

1. A lise celular ocorreu num tubo de 1,5ml por adição de 1ml de água desionizada e autoclavada à amostra de tecido com 30µl de sangue (cortada em pequenos fragmentos), durante uma hora, à temperatura ambiente.
2. Centrifugou-se por 3 minutos a 14000 rpm.
3. Retirou-se e eliminou-se o sobrenadante de cada amostra, deixando cerca de 30µl no tubo.
4. Adicionaram-se 170µl de *Chelex* a 5% a cada amostra.
5. Colocaram-se no banho a 56°C, durante 30 minutos.
6. Agitaram-se e ferveram-se os tubos durante 8 minutos.

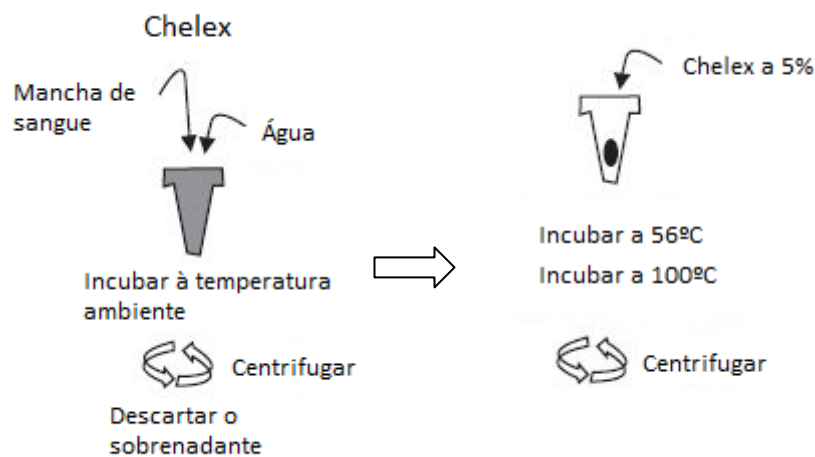


Figura 12. Representação esquemática da extração por *Chelex*. Adaptada de Butler (2005)

3.2.1.3. Extração de ADN pelo *kit QIAamp DNA Investigator* (QIAGEN)

A extração de ADN pelo *kit QIAamp DNA Investigator* utiliza uma tecnologia que permite a purificação e a recuperação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN na presença de inibidores da PCR. Este método de extração baseia-se na adsorção seletiva do ADN a partículas de sílica, que estão presentes nas colunas de centrifugação sob a forma de membranas. As células são lisadas e o ADN desnaturado com recurso a um tampão de lise com uma elevada concentração de sais caotrópicos (ex. cloridrato de guanidina), que desnaturam o ADN por rompimento das ligações de hidrogénio entre o ADN e a água, e entre o ADN e as histonas, tornando-o termodinamicamente mais estável na presença de uma solução alcoólica. Além de desnaturarem o ADN, inativam igualmente nucleases. Para que ocorra a ligação do ADN às partículas de sílica é igualmente importante que o pH do meio em solução seja ácido. Para que o ADN seja eluído e recuperado após a sua purificação, aumenta-se o pH da solução com um tampão de eluição (QIAGEN, 2007).

Este protocolo compreendeu 4 fases:

1. A **lise celular** ocorreu num tubo de 2ml, na presença de quantidade de Tampão de Lise, que variou entre 300µl para o algodão e a licra e 600µl para a ganga, suficiente para cobrir totalmente a amostra de tecido com 30µl de sangue (cortada em pequenos fragmentos) e 20µl de proteinase K, durante 1 hora a 56°C com agitação (900rpm). Após este período adicionaram-se 300µl de um segundo Tampão de Lise e 1µl de *RNA carrier*² a cada amostra e incubou-se durante 10 minutos a 70°C com agitação. Decorrido este tempo, se ainda existiam partículas sólidas, transferia-se toda a amostra e lisado para uma coluna perfurada num tubo de 1,5mL e após centrifugação à velocidade máxima durante 2 minutos, recuperava-se todo o lisado.
2. A **ligação do ADN** à membrana de sílica foi realizada mediante a homogeneização do lisado com 150µl de etanol (96% - 100%), transferência do homogeneizado para uma coluna *QIAamp MinElute* e centrifugação a 8000rpm durante 1 minuto. O produto remanescente foi descartado.
3. A **purificação do ADN** foi feita por 3 sucessivas lavagens da coluna. A primeira com 500µl de Tampão de lavagem 1 (preparado com 25ml de etanol (96 – 100%)), a segunda com 700 µl de Tampão de lavagem 2 (preparado com 30ml de etanol (96 – 100%)) e por fim a terceira com 700µl de etanol, procedendo-se, entre cada lavagem, a uma centrifugação de 1 minuto a 8000rpm, descartando-se o remanescente. No final das lavagens a coluna foi centrifugada durante 3 minutos à velocidade máxima, transferida para um tubo de 1,5ml e incubada durante 3 minutos a 56°C, com a tampa da coluna aberta, para uma total secagem da membrana.
4. Após secagem da membrana, a **eluição do ADN** foi feita por adição de 20µl de Tampão de eluição a cada coluna, incubação durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação durante 1 minuto à velocidade máxima.

3.2.1.4. Extração de ADN pelo *kit DNA IQ™ System* (Promega)

A extração de ADN pelo *kit DNA IQ™ System* utiliza uma tecnologia idêntica à do *kit* da QIAGEN, permitindo igualmente a purificação e a recuperação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN e na presença de inibidores da PCR. Este método de extração baseia-se na afinidade do ADN a partículas de sílica revestidas por uma resina paramagnética que, na presença de um suporte magnético, promove o isolamento da resina-ADN durante a purificação do ADN. Este sistema foi desenhado para purificar rapidamente pequenas quantidades de ADN, sem a utilização de reagentes muito tóxicos, que permite obter resultados consistentes para determinado tipo de amostra.

Numa primeira fase as células são lisadas com recurso a um tampão de lise, e o conteúdo celular é libertado para o meio. Este tampão contém elevada concentração de sais

² *RNA carrier* - tem a capacidade de aumentar a recuperação de ADN, em amostras com poucas moléculas de ADN, possivelmente pela ligação do *RNA carrier* a determinados locais da membrana de sílica os quais deteriam irreversivelmente os ácidos nucleicos, minimizando a perda de ADN (Shaw, Thain et al. 2009).

caotrópicos, que rompem as ligações de hidrogénio entre o ADN e a água, desnaturando-o e tornando-o termodinamicamente mais estável. Como o pH do meio é inferior a 7 as moléculas de ADN ligam-se, reversivelmente, às partículas magnéticas. Com recurso a um suporte magnético, as partículas de resina com o ADN ligado que se encontram em suspensão, são arrastadas na direção do suporte, deixando os inibidores e outros contaminantes em solução. Estes contaminantes são então eliminados durante múltiplas lavagens purificando desta forma, o ADN presente na solução. Por fim, para que o ADN seja eluído e recuperado após a sua purificação, aumenta-se o pH da solução, com um tampão de eluição (Promega, 2006).

Este protocolo compreendeu igualmente 4 fases:

1. A **lise celular** ocorreu num tubo de 2mL, no qual se adicionou à amostra de tecido com 30µl de sangue (cortada em pequenos fragmentos), o Tampão de Lise (por cada 100µl de Tampão de lise adicionou-se 1µL de dithiothreitol (DTT) a 1M), cujo volume variou entre 300µl - para o algodão e a licra - e 600µl para a ganga, durante 30 minutos a 70°C. Decorrido este tempo, se ainda existiam partículas sólidas, transferia-se toda a amostra e lisado para uma coluna perfurada num tubo de 1,5mL e após centrifugação à velocidade máxima durante 2 minutos, recuperava-se todo o lisado.
2. A **ligação do ADN** às partículas magnéticas foi realizada mediante incubação do lisado com 7µL de resina durante 5 minutos e homogeneização da mistura durante 3 segundos, a cada minuto.
3. A **purificação do ADN** foi feita por 4 lavagens sucessivas, encontrando-se os tubos colocados no suporte magnético. A primeira lavagem foi feita com 100µL de Tampão de Lise e as seguintes três lavagens foram com 100µL de Tampão de Lavagem. Entre lavagens a solução resultante foi descartada. No final das lavagens a resina-ADN foi seca à temperatura ambiente durante 5 minutos, com a tampa do tubo aberta, encontrando-se no suporte magnético.
4. Após secagem da resina-ADN, a **eluição do ADN** foi feita por adição de 30µL de Tampão de eluição, homogeneização da solução e incubação durante 5 minutos a 65°C. No final deste período de incubação, o tubo foi colocado no suporte magnético e o eluato, contendo o ADN, foi recolhido para um novo tubo de 1,5mL.

Nota: O protocolo descrito no manual do *DNA IQ™ System* recomenda a preparação do tampão de lavagem do *kit* por adição de 15mL de etanol e 15mL de álcool isopropílico (isopropanol). No entanto, introduziu-se uma modificação na preparação do mesmo, tendo-se eliminado o álcool isopropílico (**Anexo IV**).

3.2.1.5. Extração automática de ADN pelo *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System* com o *kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction* (AB)

A extração de ADN pelo *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System* (um equipamento de extração automático) com recurso ao *kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction*, utiliza uma tecnologia idêntica à do *kit DNA IQ™ System* da Promega, sendo no entanto as partículas magnéticas deste *kit* menores do que as do *DNA IQ* (Promega), tendo por isso no seu

conjunto uma maior superfície e consequentemente maior capacidade de aderência do ADN. Este sistema foi desenhado para purificar rapidamente pequenas quantidades de ADN, sem a utilização de reagentes muito tóxicos, o que permite obter resultados consistentes para determinado tipo de amostra (Biosystems, 2010).

Este protocolo compreendeu as seguintes fases:

1. A **lise celular** ocorreu numa coluna perfurada num tubo de 2 mL, no qual se adicionou à amostra de tecido com 30µL de sangue (cortada em pequenos pedaços), Tampão de Lise (preparado com 500µL e 5µL de dithiothreitol (DTT) a 1M), cujo volume variou entre 500µL - para o algodão e a licra - e 600µL para a ganga, durante 40 minutos a 70°C com agitação (750rpm). Decorrido este tempo centrifugou-se a amostra a 10000g durante 2 minutos e recuperou-se todo o lisado.
2. Este lisado foi colocado no *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System* e as três fases seguintes, **ligação do ADN** às partículas magnéticas, **purificação** e **eluição do ADN** extraído (em 50µL de tampão de eluição) ocorreram no *robot*, tendo a duração de aproximadamente 30 minutos.

3.2.2. Purificação do ADN extraído

As amostras de ADN extraídas com *Chelex®* (com exceção das amostras colocadas dentro de uma habitação, à superfície de um solo de um bosque e as lavadas com detergente e lixívia) foram purificadas e concentradas com colunas *Microcon® Ultracel YM-100 Centrifugal Filter* (Millipore) ou *Amicon® Ultra 0.5 mL* (Millipore) e com hidróxido de sódio (NaOH) (Bourke et al., 1999).

O processo de purificação da Millipore é feito através de uma membrana que deixa apenas passar moléculas de tamanho inferior a 100 KDa, retendo nesta o ADN e permitindo assim eliminar alguns inibidores do ADN. O tratamento simultâneo com hidróxido de sódio (NaOH) permite a neutralização de alguns inibidores presentes na amostra extraída.

O protocolo compreendeu as seguintes etapas:

1. Adicionaram-se 50µL de amostra extraída à coluna *Microcon®* + 200µL de NaOH a 400 mM.
2. Centrifugou-se por 20 minutos (500g).
3. Descartou-se o eluato.
4. Adicionaram-se 400µL de NaOH a 400 mM.
5. Centrifugou-se por 20 minutos (500g).
6. Adicionaram-se 400µL de Tris a 10 mM com pH 7.5.
7. Centrifugou-se por 20 minutos (500g).
8. Inverteu-se a coluna *Microcon®* ou *Amicon®*.
9. Centrifugou-se por 3 minutos (1000g).
10. Ressuspendeu-se o eluato com 15µL de Tris a 10mM com pH 7.5.

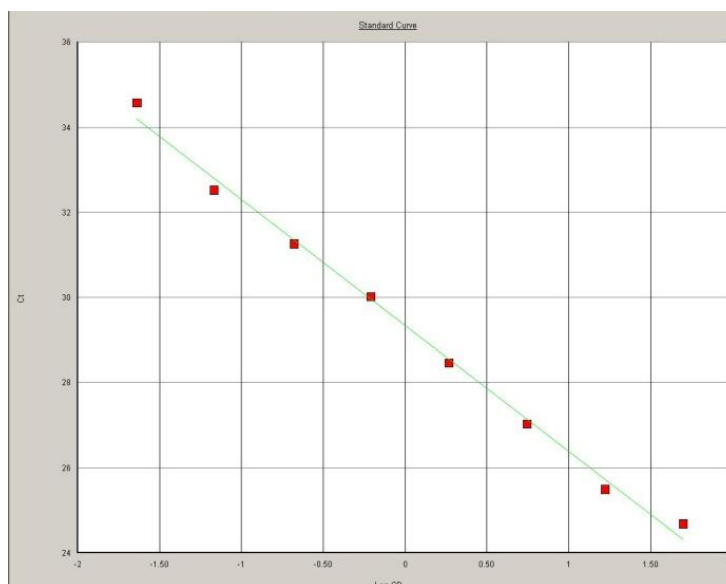
3.2.3. Quantificação por PCR em tempo real

O ADN foi quantificado, por PCR em tempo real, com o kit *Quantifiler™ Human DNA Quantification* (AB) de acordo com as instruções do manual, num ABI Prism® 7000 (Biosystems, 2007b).

O protocolo compreendeu as seguintes fases:

1. Preparou-se a curva de calibração (**Figuras 13a e 13b**), para a qual se realizaram 8 ou 9 diluições sucessivas do *standard* (amostras processadas em duplicado) com as seguintes concentrações 50ng/μL, 16,7ng/μL, 5,56ng/μL, 1,85ng/μL, 0,62ng/μL, 0,21ng/μL, 0,068ng/μL, 0,023ng/μL e 0,0076ng/μL.
2. Misturou-se num tubo *ependorf* de 1,5ml: 5,25μL de *Quantifiler Human Primer Mix* + 6,25μL de *Quantifiler PCR Reaction Mix* + 0,5μL de BSA³ (Albumina do Soro Bovino) [0,3%] por amostra.
3. Agitou-se e centrifugou-se.
4. Distribuíram-se 12μL por cada poço correspondente.
5. Adicionou-se 1μL da amostra/*standard*/controlo positivo/controlo negativo por cada poço correspondente.
6. Selou-se a placa.
7. Centrifugou-se a placa para remover qualquer bolha.
8. Colocou-se no ABI Prism® 7000 durante 1 hora e 45 minutos.

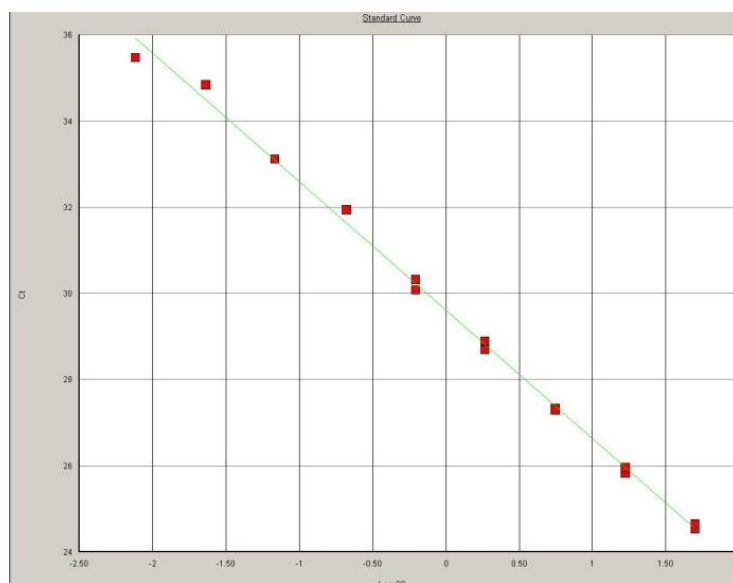
a)



³ BSA: No sentido de ultrapassar a presença de inibidores foi colocada BSA. Esta proteína impede que alguns inibidores presentes no produto extraído inibam a atividade da ADN Taq Polimerase, presumivelmente por se ligar aos mesmos (Akane, Mtsubara et al. 1994).

R^2	0,994733
Equação da reta	$Y = -2,96x + 29,34$

b)



R^2	0,996914
Equação da reta	$Y = -2,98x + 29,60$

Figura 13. Curvas de calibração calculadas com diferentes concentrações de *standard*; **a)** 50 ng/μL, 16,7 ng/μL, 5,56 ng/μL, 1,85 ng/μL, 0,62 ng/μL, 0,21 ng/μL, 0,068 ng/μL e 0,023 ng/μL e **b)** 50 ng/μL, 16,7 ng/μL, 5,56 ng/μL, 1,85 ng/μL, 0,62 ng/μL, 0,21 ng/μL, 0,068 ng/μL, 0,023 ng/μL e 0,0076 ng/μL.

3.2.4. Amplificação do ADN por PCR

Foram utilizados diferentes *kits* de amplificação da *Applied Biosystems*. A escolha do *kit* adequado às diferentes amostras teve como base a quantidade de ADN presente em cada uma. Os protocolos para os *kits* de amplificação *AmpFℓSTR® Identifier™*, *AmpFℓSTR® Identifier Plus™*, *AmpFℓSTR® MiniFiler™* ou *AmpFℓSTR® NGM™ SElect* foram realizados de acordo com as instruções do manual de utilizador (ou instruções adaptadas), num termociclador *GeneAmp® PCR Systems 2700* ou *9700* (AB). A amplificação com o *kit AmpFℓSTR® NGM SElect™* foi apenas realizada em algumas amostras nas quais os *kits AmpFℓSTR® Identifier*, *AmpFℓSTR® Identifier Plus™* e *AmpFℓSTR® MiniFiler™* não possibilitaram os resultados esperados.

O protocolo geral de amplificação para os diferentes *kits* compreendeu as seguintes fases:

1. Misturou-se num tubo *ependorf* de 1,5ml: 2,5μL de *Primer Mix* + 5μL de *PCR Master Mix* por amostra, se o volume final da reação foi de 12,5μL; ou 5μL de *Primer Mix* + 10μL de *PCR Master Mix* por amostra, se o volume final da reação foi de 25μL.
2. Agitou-se e centrifugou-se.

3. Distribuíram-se 7,5µL ou 15µL da mistura por cada tubo correspondente, consoante o volume final da reação foi de 12,5µL ou 25µL, respetivamente.
4. Adicionou-se entre 1 e 5µL (**Tabela 5**) da amostra extraída, caso o volume final da reação fosse de 12,5µL e entre 1 e 10µL (**Tabela 5**) se o volume final da reação fosse de 25µL, por cada tubo correspondente, perfazendo o volume final com tampão TE de concentração 10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0.
5. Colocou-se num termociclador.

Tabela 5 - Intervalo de concentrações de ADN da amostra utilizado em cada *kit* de amplificação.

<i>Kit</i>	Gama de quantidade ideal de ADN	Gama de concentrações de ADN da amostra
<i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	0,5ng – 0,75ng	0,01 e 0,09ng/µl
<i>AmpFℓSTR® Identifiler™ e Identifiler Plus™</i>	0,5ng – 1,25ng	Igual ou superior a 0,09ng/µl

3.2.4.1. *AmpFℓSTR® Identifiler™* (AB)

O *AmpFℓSTR® Identifiler™* é um *kit* de amplificação que permite amplificar 15 marcadores (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, FGA e D5S818) e a Amelogenina em multiplex. Utiliza um sistema de 4 fluorocromos (6-FAM™, VIC™, NED™ e PET™), cada um dos quais marca um dos *primers* do par que amplifica cada um dos marcadores. Estes fluorocromos emitem fluorescência máxima a diferentes comprimentos de onda, permitindo desta forma separar os conjuntos de marcadores. Além de diferentes fluorocromos o *kit* envolve ainda modificadores de mobilidade que se encontram ligados à extremidade 5' do *primer*. Estes modificadores de mobilidade permitem que os STRs com tamanhos idênticos consigam ser separados. Os marcadores amplificados por este *kit* têm entre 100bp e 350bp. A quantidade de ADN inicial varia entre 0,5ng e 1,25ng (**Tabela 5**) e o volume de amostra extraída a colocar pode variar até ao máximo de 5µl (protocolo adaptado). O ciclo utilizado para este *kit* de amplificação encontra-se ilustrado na **Figura 14**. O número de ciclos de PCR pode variar até 28 (Biosystems, 2001).

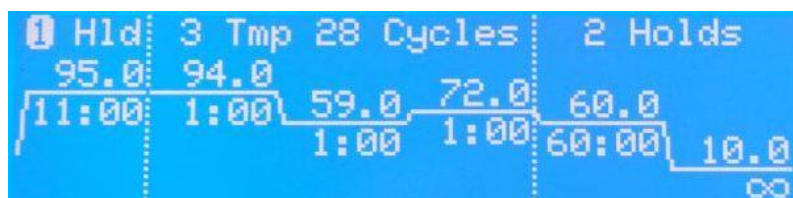


Figura 14. Ciclo de PCR do *AmpFℓSTR® Identifiler™*.

3.2.4.2. *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifier Plus $^{\text{TM}}$* (AB)

O *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifier Plus $^{\text{TM}}$* é um kit de amplificação com os mesmos marcadores e fluorocromos que o original *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifier $^{\text{TM}}$* , com o mesmo poder de discriminação, mas com uma maior sensibilidade e robustez. O tempo de amplificação foi reduzido em cerca de uma hora e o desempenho na presença de amostras inibidas foi melhorado. O processo de síntese e purificação dos *primers* foi melhorado, fornecendo um *background* da eletroforese mais limpo. Para este kit o ciclo de amplificação utilizado encontra-se na **Figura 15** (Biosystems, 2011a).

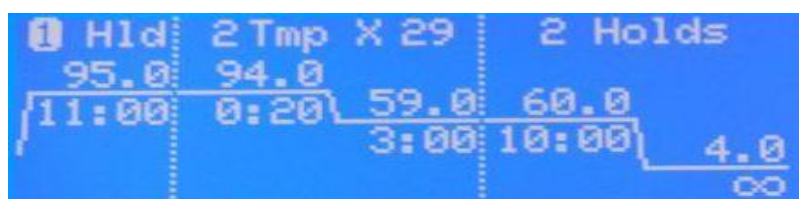


Figura 15. Ciclo de PCR do *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifier Plus $^{\text{TM}}$* .

3.2.4.3. *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$* (AB)

O *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$* permite amplificar 8 marcadores comuns ao *AmpF ℓ STR Identifier* (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO e FGA) e a Amelogenina. À semelhança do kit *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifier*, utiliza um sistema de 4 fluorocromos (Biosystems, 2007a).

A quantidade de ADN recomendada varia entre 0,5ng e 0,75ng (**Tabela 5**) e o volume de amostra extraída a amplificar pode variar até ao máximo de 10 μ l. O número de ciclos de PCR pode ir até 30. O ciclo de amplificação utilizado para este kit encontra-se na **Figura 16** (Biosystems, 2007a).

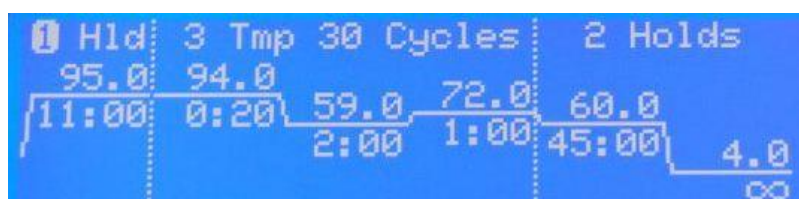


Figura 16. Ciclo de PCR do *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$* .

3.2.4.4. *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM $^{\text{TM}}$ SElect* (AB)

O *AmpF ℓ STR $^{\circ}$ NGM $^{\text{TM}}$ SElect* permite amplificar em multiplex 13 marcadores tetranucleótidos (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433,

TH01, FGA, D1S1656, D12S391 e SE33), 3 MiniSTRS (D10S1248, D22S1045 – trinucleótido - e D2S441) e a Amelogenina. Este conjunto de marcadores tem o maior poder de discriminação, sensibilidade e robustez de qualquer *kit AmpFℓSTR®*. Utiliza o mesmo sistema de fluorocromos que o *AmpFℓSTR® Identifier™*. O *kit* utiliza condições de PCR de maior sensibilidade e tem um desempenho melhorado na presença de amostras inibidas e degradadas, uma vez que apresenta um maior número de *loci* concentrado na região de menor peso molecular. O processo de síntese e purificação dos *primers* foi melhorado fornecendo um *background* da eletroforese mais limpo.

A quantidade de ADN inicial ideal é de 1ng e o volume de amostra extraída a colocar pode variar até ao máximo de 10µl. O número de ciclos de PCR pode ir até 30 e o ciclo utilizado neste trabalho foi o indicado na **Figura 17**. (Biosystems, 2011b).

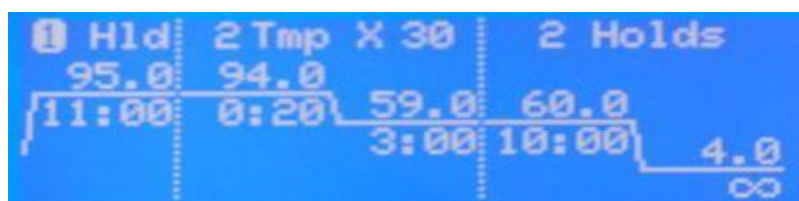


Figura 17. Ciclo de PCR do *AmpFℓSTR® NGM™ SElect*.

3.2.5. Análise dos produtos amplificados

A análise das amostras amplificadas foi efetuada nos sequenciadores automáticos ABI Prism 3130 e ABI Prism 3500 (AB) com recurso aos *softwares* GeneMapper v.3.2 e GeneMapper® ID-X, respetivamente.

O protocolo compreendeu as seguintes fases:

1. Misturou-se num tubo *ependorf* de 1,5ml: 10,5µL de Formamida + 0,5µL de *standard* por amostra.
2. Agitou-se e centrifugou-se.
3. Distribuíram-se 11µL por cada poço de uma placa de 96 poços.
4. Adicionou-se entre 1 e 4µL de amostra amplificada.
5. Colocou-se uma *septa*.
6. Agitou-se e centrifugou-se.
7. Desnaturou-se durante 3 minutos num termociclador a 95°C.
8. Colocou-se nos sequenciadores automáticos ABI Prism 3130 ou ABI Prism 3500.
9. Analisaram-se os eletroferogramas com recurso aos programas GeneMapper v.3.2 e GeneMapper® ID-X, nos ABI Prism 3130 ou ABI Prism 3500 respetivamente.

4. Análise e discussão dos resultados

Análise e discussão dos resultados

O estudo das amostras neste trabalho permitiu obter ADN nuclear com uma grande variabilidade na quantidade e qualidade na dependência de diferentes condições de degradação.

A determinação da quantidade e qualidade de ADN de cada amostra foi essencial para a obtenção de um perfil genético completo, ou seja, do conjunto de todos os genótipos de todos os marcadores analisados.

Das 1512 amostras extraídas, apenas 782 amostras proporcionaram material extraído suficiente para serem amplificadas com os kits *AmpFℓSTR® Identifiler™/ AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*, *AmpFℓSTR® MiniFiler™* ou *AmpFℓSTR® NGM SElect™*.

Algumas amostras apresentaram um perfil incompleto para o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™* ou *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* (entendendo-se como perfil incompleto um perfil no qual um ou mais alelos de um ou mais marcadores não apresentem amplificação), todavia, apresentaram um perfil completo para o *AmpFℓSTR® MiniFiler™* ou *AmpFℓSTR® NGM SElect™*. Sucedeu ainda que alguns perfis incompletos obtidos com os diversos kits em conjunto se complementaram para a obtenção de um perfil completo.

Os perfis completos obtidos com os diferentes kits de amplificação para as amostras de referência dos três indivíduos, encontram-se nas **Tabelas 6, 7 e 8 (Anexo I)**.

Para a análise das amostras nos diversos meios de degradação foram utilizadas diferentes designações em função do tipo de extração (*Chelex*, *QIAamp DNA Investigator*, *DNA IQ System*). Exemplo: Às amostras de ganga do indivíduo **N** colocadas durante 1 dia no solo argiloso foram atribuídos os números de análise: **a)** 64 quando extraída por *DNA IQ System*; **b)** 46 quando extraída por *Chelex* e **c)** 226 quando extraída por *QIAamp DNA Investigator*.

De seguida são apresentados e discutidos os resultados obtidos por cada forma de degradação.

4.1. Amostras enterradas em solo pantanoso

Os resultados da quantificação das 108 amostras enterradas em solo pantanoso mostram que a quantidade de ADN é extremamente diminuta para a obtenção de perfis de STRs (**Tabela 9a – Anexo I**). A reduzida quantidade de ADN obtida deveu-se muito provavelmente à constituição do solo, à elevada percentagem de humidade do mesmo e à proliferação microbiana resultante da elevada temperatura registada na época de verão, que levou à rápida degradação do ADN. Esta degradação em conjunto com a presença de inibidores (nomeadamente de ácidos húmicos), inviabilizou a análise de muitas amostras sujeitas a estas condições.

Para as amostras colocadas em Junho de 2009, encontram-se na **Tabela 10** as variações de temperatura e precipitação ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo pantanoso até 15 dias após a sua colocação.

Tabela 10. Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo pantanoso até 15 dias após a sua colocação (época de verão).

	27.06.09 – 29.06.09 (3 dias antes da colocação)	30.06.09 (colocação)	01.07.09 (1 dia) a 03.07.09 (3 dias)	04.07.09 a 7.07.09 (7 dias)	08.07.09 a 15.07.09 (15 dias)
Precipitação (mm)	17,8 mm	0,1mm	0,3mm	1,3mm	1,4mm
Temp min (°C)	12,5°C	18,5°C	15°C	13,5°C	12,5°C
Temp max (°C)	27,5°C	26,5°C	26,5°C	25°C	29°C

Para as amostras nos vários suportes (ex. algodão – **Figura 18**) enterradas durante o período de verão foram apenas obtidos resultados aceitáveis para as amostras extraídas com o *kit QIAamp DNA Investigator* até ao final de 1 dia (valor máximo (máx.) de quantificação de 0,0261ng/μl) (**Tabela 9a – Anexo I**).



Figura 18. Fotografia representativa do tecido algodão enterrado em solo pantanoso, ao fim de 1 dia.

Estudos realizados com algumas amostras enterradas em solo pantanoso e extraídas com o *kit Prepfilier Express* proporcionaram melhores resultados quantitativos (máx. de 5,1710ng/μl), entre um e sete dias, quando comparados com as restantes metodologias de extração (**Tabela 9b – Anexo I**). Este *kit* possibilitou obter em uma amostra material suficiente para amplificação com *AmpFℓSTR® Identifiler Plus™* e em quatro amostras, material suficiente para amplificar com *AmpFℓSTR® MiniFiler™*, tendo-se obtido perfis completos (**Tabela 9b – Anexo I**).

Este facto mostra que além do elevado nível de degradação do ADN, as amostras contêm ainda inibidores da PCR (ex. ácidos húmicos) que comprometem a técnica da quantificação por PCR em tempo real. Desta forma os resultados quantitativos das amostras extraídas pelos diferentes métodos são inferiores aos reais, o que é corroborado com os valores de IPC que são em algumas das amostras inferiores quando extraídos com *Prepfilier Express*, uma vez que este é mais eficaz na eliminação de inibidores.

Algumas amostras enterradas em solo pantanoso foram igualmente extraídas pelo método orgânico, que demonstrou não ser muito eficaz a remover os inibidores presentes nestas amostras (uma vez que foi necessário diluí-las em fatores de 20, 30 e 40, para obter valores de IPC não indeterminados (ind.)). No entanto, após diluição, foi possível obter em

duas amostras material suficiente para amplificação com *AmpFℓSTR® Identifier Plus™*, resultando em perfis completos. Foi ainda possível obter material suficiente para amplificar com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* em uma amostra, permitindo a obtenção de perfil completo (**Tabela 9c – Anexo I**).

O solo pantanoso (Paúl) é um solo quimicamente ácido, muito rico em óxido de magnésio, óxido de sódio, manganésio e zinco (**Tabela 4 em Material e Métodos**). O zinco e o manganésio são cofatores de nucleases que degradam o ADN. Estas características, além das já anteriormente referidas na introdução para este tipo de solo, podem ajudar a explicar a rápida degradação do ADN verificada em tão pouco tempo.

Das 108 amostras quantificadas, foi apenas possível obter-se ADN nuclear suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* em sete amostras, em que apenas cinco resultaram num perfil completo (**Tabela 11 – Anexo I**), uma resultou num perfil parcial (amostra 137) e uma não apresentou amplificação dos marcadores.

As condições de amplificação e aplicação para a amostra que apresentou perfil parcial com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Condições de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* e aplicação da amostra 137, enterrada em solo pantanoso.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
137	NI	1 dia	QIAamp	0,0105	29.94	10	4	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

O perfil genético da amostra 137 extraída por *QIAamp DNA Investigator*, obtido após amplificação, não ficou completo para o marcador D21S11 (**Figura 19 em Anexo II**), pelo que provavelmente se trata de uma amostra degradada.

A mesma amostra, quando extraída com *Chelex* ou com o *kit DNA IQ System*, não permitiu a obtenção de quantidade de ADN para a sua amplificação (**Tabela 9 – Anexo I**).

O facto de se tratar de uma mancha de sangue em licra, pode igualmente ter contribuído para a redução da possibilidade da amostra conter ADN suficiente para ser amplificado, uma vez que a crosta de sangue formada à superfície do tecido pode ter sido eliminada ao longo do tempo.

4.2. Amostras colocadas em solo argiloso

Analisando os resultados da quantificação das 297 amostras enterradas em solo argiloso, (**Tabela 13 – Anexo I**) e comparando os resultados obtidos nos primeiros 3 dias de colocação das amostras, nas épocas de verão e inverno, verificou-se que a diminuição da quantidade de ADN presente foi muito mais rápida no verão (mínima (min) a máx: 0,0048 –

28,3235ng/ μ l) do que no inverno (min. a máx: 0,4257 – 21,7452ng/ μ l), tendo como exemplo o *QIAamp DNA Investigator*. As características deste solo aliadas à humidade e temperatura elevadas levaram à proliferação microbiana, que com a consequente produção de nucleases, promoveram a rápida degradação do ADN verificada durante a época de verão.

A quantidade de ADN presente nas amostras colocadas na época de inverno diminuiu drasticamente a partir do 7º dia (para as diferentes metodologias de extração, a maioria das amostras apresentou valores reduzidos de quantificação), provavelmente devido ao aumento da pluviosidade verificada (**Tabela 14a**), o que poderá ter levado à remoção do material biológico pela água da chuva (**Tabela 13 – Anexo I**). Na época de verão, o aumento da temperatura proporcionou a secagem do solo, que se encontrava húmido devido à pluviosidade verificada nos dias antecedentes a esta colheita, levando à menor degradação do ADN das amostras (**Tabela 14b**).

Tabela 14. Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo argiloso até 15 dias durante o inverno (**a**) e até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (**b**)

a) Amostras colocadas no dia 06.03.2010 (inverno):

	02.03.10 – 05.03.10 (3 dias antes da colocação)	06.03.10 (colocação)	07.03.10 (1 dia) a 09.03.10 (3 dias)	10.03.10 a 13.03.10 (7 dias)	14.03.10 a 21.03.10 (15 dias)
Precipitação (mm)	0mm	0mm	0mm	0mm	22,5mm
Temp min (°C)	8,5°C	8,5°C	1,5°C	2°C	7,5°C
Temp max (°C)	17,5°C	13,5°C	14°C	15°C	20°C

b) Amostras colocadas no dia 30.06.2009 (verão):

	27.06.09 – 29.06.09 (3 dias antes da colocação)	30.06.09 (colocação)	01.07.09 (1 dia) a 03.07.09 (3 dias)	04.07.09 a 7.07.09 (7 dias)	08.07.09 a 15.07.09 (15 dias)	16.07.09 a 30.07.09 (30 dias)	31.07.09 a 28.09.09 (3 meses)
Precipitação (mm)	17,8mm	0,1mm	0,3mm	1,3mm	1,4mm	27,2mm	22,9mm
Temp min (°C)	12,5°C	18,5°C	15°C	13,5	12,5°C	11,5°C	10,5°C
Temp max (°C)	27,5°C	26,5°C	26,5°C	25°C	29°C	37,5°C	37,5°C

Ao 15º dia, a degradação foi semelhante em ambas as épocas, ou seja, maioritariamente obtiveram-se valores indeterminados de quantificação (**Tabela 13 – Anexo I**). Contudo, durante a época de verão foi possível obter-se perfis genéticos completos de amostras de sangue em algodão extraídas com *Chelex* seguida de purificação com *Microcon*® e NaOH até ao final de 3 meses (**Figura 20**), enquanto que para as amostras de inverno foi só possível obter-se perfis genéticos completos de amostras de sangue nos vários tecidos até ao final de 7 dias,

extraídas com o *kit QIAamp DNA Investigator* e com a metodologia de *Chelex* seguida de purificação com *Microcon*® e NaOH.



Figura 20. Fotografia do tecido de algodão do dador O enterrado em solo argiloso durante 3 meses no período de verão.

O solo argiloso é um solo quimicamente ácido, igualmente rico em óxido de magnésio, manganésio e zinco, embora em menor quantidade que o solo pantanoso. O zinco e o manganésio são cofatores de nucleases que degradam o ADN. Estas características do solo, além das anteriormente referidas, podem ajudar igualmente a explicar a degradação do ADN verificada neste ambiente (**Tabela 4** em **Material e Métodos**).

Das 297 amostras analisadas, foi possível obter-se material extraído suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* em 64 amostras (**Tabela 15 – Anexo I**), das quais 61 resultaram num perfil completo, duas resultaram num perfil incompleto e uma não apresentou amplificação dos marcadores. Obteve-se ainda material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* em 39 amostras tendo-se obtido em apenas 30 um perfil completo. Em três destas amostras obtiveram-se perfis incompletos e as restantes 6 não apresentaram amplificação dos marcadores.

Ao analisar a **Tabela 15 (Anexo I)** verifica-se que para a época de verão foram obtidas um total de 20 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* enquanto que na época de inverno foram obtidos 41 perfis genéticos completos (factos que evidenciam a maior degradação das amostras no verão do que no inverno). Verifica-se ainda que para a época de verão foram obtidas um total de 21 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* enquanto que na época de inverno foram obtidos apenas 10 perfis genéticos completos.

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfil incompleto com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* encontram-se reunidas na **Tabela 16**.

Provavelmente não se trata de amostras degradadas, mas sim de amostras que apresentaram, em conjunto com o produto extraído, inibidores (ex. ácidos húmicos) que impediram a amplificação dos alelos de alguns dos marcadores de maior tamanho. O valor de IPC encontrado (dentro dos valores normais) deveu-se muito provavelmente à utilização de BSA.

Tabela 16 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 64 (verão) e 911 (inverno) enterradas em solo argiloso com o kit *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Identifier* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
64	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	0,1957	28.58	6 e 10	3	20	Parcial
911	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	0,2755	28.31	6	4	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus* é 25μl

O perfil genético da amostra 64 obtido após amplificação não se encontrou completo em diversos marcadores - D821179, D7S820, D13S317, D16S539, D19S433, D18S51, D5S818, Amelogenina e FGA (**Figura 21** em **Anexo II**).

As amostras sujeitas às mesmas condições quando extraídas por *Chelex* (amostra 46 – **Tabela 15** em **Anexo I**) e *QIAamp DNA Investigator* (amostra 226 – **Tabela 15** em **Anexo I**) possibilitaram a obtenção de produto extraído suficiente para ser amplificado com *AmpFℓSTR® Identifier™* (**Tabela 13** – **Anexo I**), possibilitando a obtenção de perfis completos.

O facto dos marcadores CSF1PO e D2S1338 terem amplificado, reforça a ideia da presença de inibidores na amostra. Para além destes, a possibilidade da amostra conter muito material no momento da amplificação, poderá explicar o *drop-out* dos marcadores de menor tamanho - D821179, D19S433, Amelogenina e D5S818.

O perfil genético da amostra 911 obtido após amplificação não se encontrou completo para os marcadores D7S820 e D2S1338 (**Figura 22** em **Anexo II**).

Das amostras sujeitas às mesmas condições e extraídas pelos restantes métodos, só a amostra extraída com *QIAamp DNA Investigator* (amostra 929 - **Tabela 15** em **Anexo I**) possibilitou a obtenção de material suficiente para a sua amplificação com *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus* (**Tabela 13** – **Anexo I**) e obtenção de perfil completo.

A amostra 911 quando amplificada com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* permitiu ainda obter um perfil genético completo (**Tabela 17**; **Figura 23** em **Anexo II**), o que não se verificou para a amostra 64. Estes resultados apoiam a hipótese acima apresentada, uma vez que a amplificação com este kit ajuda a ultrapassar a presença de inibidores no produto extraído.

Tabela 17 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 911 enterrada em solo argiloso com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
911	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	0,2755	28.31	4	1	20	Completo

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfis parciais com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 18**.

Provavelmente além de estas amostras se encontrarem degradadas, apresentavam no produto extraído, inibidores (ex. ácidos húmicos).

Tabela 18 - Condições de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* e aplicação das amostras 360, 533 (verão) e 1077 (inverno) enterradas em solo argiloso.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
360	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	0,0995	30.06	2	4	20	Parcial
533	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	0,0312	28.72	10	1	20	Parcial
1077	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	0,0177	29.05	9	1	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

O perfil genético da amostra 360 obtido após amplificação não se encontrou completo para o marcador CSF1PO (**Figura 24 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições ambientais, quando extraída com recurso ao *kit QIAamp DNA Investigator* (amostra 540 - **Tabela 15 em Anexo I**), possibilitou obter um perfil completo com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*. O mesmo não sucedeu para a amostra quando extraída por *Chelex*, uma vez que este método de extração não permitiu a obtenção de material suficiente para a sua amplificação (**Tabela 13 – Anexo I**). Estes resultados ajudam a confirmar a possibilidade de as amostras além de degradadas, apresentarem inibidores, já que o *kit QIAamp DNA Investigator* elimina-os mais eficazmente.

O perfil genético da amostra 533 obtido após amplificação, não se encontrou completo para a maioria dos marcadores (**Figura 25 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições degradativas, extraída com recurso ao *kit DNAIQ* (amostra 353 - **Tabela 15 em Anexo I**) e amplificada com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* possibilitou a obtenção de perfil completo, no entanto a amostra quando extraída com *Chelex* não possibilitou a obtenção de material suficiente para a sua amplificação (**Tabela 13 – Anexo I**). Esta amostra encontrava-se provavelmente muito degradada e com pouco material, pelo que o *kit DNA IQ System* e o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* tornaram possível a sua tipagem.

O perfil genético da amostra 1077 obtido após amplificação não se encontrou completo para os marcadores D21S11, D2S1338, D16S539, Amelogenina e FGA (**Figura 26 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições ambientais, quando extraída pelos restantes métodos não possibilitou a obtenção de material suficiente para a sua amplificação (**Tabela 13 – Anexo I**). Estes resultados sustentam a hipótese de se tratar de uma amostra degradada.

As condições de amplificação e aplicação para algumas das amostras que não apresentaram amplificação dos marcadores com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 19**.

Possivelmente, associado ao nível de degradação das amostras, continham ainda inibidores (ex. ácidos húmicos) no produto extraído, que impediram a sua amplificação com o *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Tabela 19 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 54 (verão) e 1058 (inverno) enterradas em solo argiloso com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
54	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	0,0472	28.68	10	1	20	sem perfil
1058	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	0,0423	28.44	10	1	20	sem perfil

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

A amostra 54 extraída com *Chelex* só proporcionou quantidade suficiente para a sua amplificação com este kit não tendo apresentado no entanto, qualquer amplificação dos marcadores.

Quando a amostra colocada nas mesmas condições foi extraída com recurso ao kit *QIAamp DNA Investigator* (amostra 234 - **Tabela 15 em Anexo I**) possibilitou a obtenção de produto extraído suficiente para ser amplificado com *AmpFℓSTR® Identifiler™*, tendo-se obtido um perfil completo, no entanto a amostra quando extraída pelo kit *DNA IQ System* (amostra 72 - **Tabela 15 em Anexo I**) só possibilitou recuperar material suficiente para a sua amplificação com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Tabela 13 – Anexo I**), resultando num perfil genético completo. Os resultados apresentados corroboram a justificação acima apresentada, ou seja, a presença de inibidores na amostra e alguma degradação.

À semelhança da amostra 54, após amplificação com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* também não foi possível obter um perfil genético para a amostra 1058.

As amostras colocadas nas mesmas condições ambientais que a amostra 1058, quando extraídas pelos kits *QIAamp DNA Investigator* e *DNA IQ System* não possibilitaram a recuperação de material suficiente para a sua amplificação (**Tabela 13 – Anexo I**).

Na tentativa de se obter a tipagem para estas amostras foi utilizado o kit *AmpFℓSTR® NGM SElect™*. Na **Tabela 20** estão apresentadas as condições experimentais realizadas para as amostras 54 e 1058 com este kit de amplificação.

Tabela 20 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 54 e 1058 enterradas em solo argiloso com o kit *AmpFℓSTR® NGM SElect™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação NGM SElect* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
54	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	0,0472	28.68	10	1	20	Completo
1058	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	0,0423	28.44	10	1	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® NGM SElect™* é 25μl

Nestas condições, foi possível obter um perfil completo para a amostra 54 (**Figura 27 em Anexo II**), no entanto o mesmo não se verificou para a amostra 1058, da qual resultou apenas um perfil parcial (**Figura 28 em Anexo II**). Estes resultados permitem concluir que a amostra 1058 se encontrava bastante mais degradada e com inibidores presentes, do que a amostra 54.

4.3. Amostras colocadas em solo arenoso

Ao comparar os resultados da quantificação das amostras recolhidas do solo arenoso nos mesmos primeiros 3 dias durante as épocas de verão e inverno verificou-se que a quantidade de ADN presente nas amostras de verão (mínima (min) a máx: ind. – 3,5145ng/μl) foi em geral ligeiramente inferior à verificada nas amostras enterradas durante a época de inverno (min. a máx: 0,0357 – 55,2686ng/μl), tendo a extração com *QIAamp DNA Investigator* como exemplo (**Tabela 21 – Anexo I**). A pluviosidade verificada durante os três dias antecedentes à colocação das amostras na época de verão (**Tabela 22 a**), juntamente com a temperatura elevada e própria desta época, proporcionaram uma maior degradação do ADN do que a verificada em igual período de inverno (**Tabela 22 b**). O aumento da pluviosidade ao longo do tempo na época de inverno poderá ter contribuído para a remoção do material biológico presente nos diferentes tecidos, o mesmo não se verificou para as amostras colocadas durante a época de verão. A diminuição de pluviosidade durante o verão juntamente com a temperatura elevada, levaram a um decréscimo da percentagem de humidade do solo, permitindo a conservação do ADN nestas amostras durante mais tempo.

Tabela 22. Variação da temperatura (°C) e precipitação (mm) ocorridas na Figueira da Foz, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo arenoso até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (**a**) e até 15 dias durante o inverno (**b**).

a) Amostras colocadas no dia 30.06.2009 (verão):

	27.06.09 – 29.06.09 (3 dias antes da colocação)	30.06.09 (colocação)	01.07.09 (1 dia) a 03.07.09 (3 dias)	04.07.09 a 07.07.09 (7 dias)	08.07.09 a 15.07.09 (15 dias)	16.07.09 a 30.07.09 (30 dias)	31.07.09 a 28.09.09 (3 meses)
Precipitação (mm)	15,1mm	0,1mm	0,1mm	3,0mm	0,3mm	0,9mm	11,6mm
Temp min (°C)	10°C	17,5°C	13,5°C	12°C	10,5°C	9°C	8°C
Temp max (°C)	27°C	28°C	25°C	24,5°C	25,5°C	27,5°C	34°C

b) Amostras colocadas no dia 06.03.2010 (inverno):

	02.03.10 – 05.03.10 (3 dias antes da colocação)	06.03.10 (colocação)	07.03.10 (1 dia) a 09.03.10 (3 dias)	10.03.10 a 13.03.10 (7 dias)	14.03.10 a 21.03.10 (15 dias)
Precipitação (mm)	0,0mm	0,0mm	12,8mm	0,3mm	39,5mm
Temp min (°C)	7°C	n.d.	0,5°C	0,0°C	5°C
Temp max (°C)	18°C	n.d.	15°C	18,5°C	20°C

n.d. – dados não disponibilizados

Para as amostras enterradas em solo arenoso durante o período de verão, foi possível obter-se quantidade de ADN suficiente para obter um perfil genético completo de amostras de sangue em algodão extraídas com *Chelex* e purificadas com *Microcon*® e NaOH até 3 meses (**Figura 29**). Para as amostras enterradas durante a época de inverno foi apenas possível

recuperar quantidade de ADN suficiente para obter um perfil genético completo em amostras de sangue em licra extraídas com *QIAamp DNA Investigator* até 7 dias.



Figura 29. Fotografia do tecido de algodão do dador P enterrado em solo arenoso durante 3 meses no período de verão.

O solo arenoso é o solo com pH mais neutro e o mais pobre em manganésio e zinco, quando comparado com os restantes solos (**Tabela 4** em **Material e Métodos**). As características físicas, químicas e biológicas (anteriormente referidas na introdução) deste tipo de solo podem ajudar a explicar a reduzida taxa de degradação do ADN verificada, quando comparada com os restantes tipos de solos.

Do total de 324 amostras quantificadas, foi possível obter-se material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™ / AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* em 108 amostras (**Tabela 23 – Anexo I**), resultando um perfil completo em 102 amostras e nas restantes 6 obteve-se um perfil parcial. Foi ainda possível recuperar material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* em 32 amostras tendo-se obtido um perfil genético completo em 16 amostras e um perfil parcial em quatro amostras. Onze amostras não possibilitaram a amplificação dos marcadores genéticos e uma amostra encontrava-se contaminada. A amostra 543 (verão), continha apenas material extraído suficiente para amplificar com este *kit*. No entanto, foi ocasionalmente amplificada com *AmpFℓSTR® Identifiler™ / AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* tendo resultado num perfil completo.

Ao analisar a **Tabela 23 (Anexo I)** verifica-se que para a época de verão foram obtidas um total de 60 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* (contabilizando com a amostra 543), enquanto que na época de inverno foram obtidos apenas 43 perfis genéticos completos. Verifica-se ainda que para a época de verão foram obtidas um total de 11 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* enquanto que na época de inverno foram obtidos apenas 4 perfis genéticos completos.

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfis parciais com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* e *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* encontram-se reunidas na **Tabela 24**. Provavelmente trata-se de amostras que apresentam em conjunto com o produto extraído, inibidores (ex. resina de pinheiro e sílica) que impedem a amplificação de alguns alelos dos marcadores de maior tamanho.

Tabela 24 - Condições de amplificação de amostras enterradas em solo arenoso com os kits *AmpFℓSTR® Identifiler™* e *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* e sua aplicação.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Identifiler (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
200	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	0,5632	28.89	1 ^a e 2 ^a	1	20	Parcial
901	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	0,1987	28.68	6 ^b e 10 ^b	4	20	Parcial
904	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	0,2358	29.35	5 ^b	4	20	Parcial
977	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	0,1390	28.44	10 ^b	3	20	Parcial
1031	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	0,3294	28.66	4 ^a	4	20	Parcial
1033	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	0,4324	27.49	1 ^a e 10 ^b	4	20	Parcial

a – amostra amplificada com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™* cujo volume final da reação é 12,5μl e b – amostras amplificadas com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* cujo volume final da reação é 25 μl.

Os perfis genéticos das amostras extraídas por *Chelex* e purificadas com *Microcon®* e NaOH (200 (verão), 901 e 904 (inverno)) obtidos após amplificação não se encontraram completos.

A amostra sujeita às mesmas condições que a amostra 200, quando extraída por *DNA IQ System* (amostra 362 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e amplificada com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*, possibilitou a obtenção de um perfil completo, no entanto quando extraída com *QIAamp DNA Investigator* (amostra 542 – **Tabela 23** em **Anexo I**) proporcionou apenas material suficiente para amplificar com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Tabela 21 - Anexo I**), tendo-se obtido um perfil parcial. A amostra 362 poderia conter uma quantidade mais reduzida de inibidores, o que favoreceu os resultados apresentados para o kit *DNA IQ System*.

Para os resultados desfavoráveis obtidos com a metodologia de extração com a resina *Chelex* poderá ainda ter contribuído o facto de a amostra conter muito ADN e ainda inibidores, justificando desta forma a não amplificação completa de alguns marcadores de maior e menor tamanho (**Figura 30 – Anexo II**).

Para a amostra 901 os marcadores D7S820, CSF1PO, D2S1338, D18S51 e FGA, não amplificaram (**Figura 31 – Anexo II**). A reforçar a hipótese de se estar perante amostras com inibidores, temos os resultados obtidos para as amostras extraídas com kits *DNA IQ System* (amostra 1118 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e *QIAamp DNA Investigator* (amostra 919 – **Tabela 23** em **Anexo I**), que permitiram a obtenção de perfis genéticos completos quando amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*. Provavelmente a utilização destas metodologias permitiu eliminar os inibidores presentes nas amostras.

A amostra 904 não proporcionou a amplificação completa dos alelos de alguns marcadores - D7S820, CSF1PO, D2S1338 e D18S51 (**Figura 32** em **Anexo II**). As amostras sujeitas às mesmas condições que a amostra 904, quando extraídas com o kit *QIAamp DNA Investigator* (amostra 922 - **Tabela 23** em **Anexo I**) e *DNA IQ System* (amostra 1121 - **Tabela 23** em **Anexo I**), possibilitaram a obtenção de perfis completos, quando amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifiler™* apoiando a hipótese da presença de inibidores no produto extraído.

As amostras 977 e 1031 (inverno), foram sujeitas às mesmas condições durante o mesmo período de tempo, mas foram extraídas por metodologias diferentes. O facto de alguns dos alelos dos marcadores de maior tamanho não terem amplificado, poderá mais uma vez indicar que se trata de amostras sujeitas a fatores de inibição (**Figuras 33 e 34 em Anexo II**). A amostra correspondente às anteriores, extraída com o *kit DNA IQ System* (amostra 1139 - **Tabela 23 em Anexo I**) e amplificada com o mesmo *kit* de amplificação, permitiu obter um perfil completo, reforçando a justificação anteriormente dada.

O perfil genético da amostra 1033 (inverno), que foi extraída por *QIAamp DNA Investigator*, obtido após amplificação, não se encontrou completo para os marcadores de maior tamanho - CSF1PO e D2S1338 (**Figura 35 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições pelo mesmo período de tempo, quando extraída pelo método de *Chelex* seguida de purificação com *Microcon*[®] e NaOH (amostra 979 - **Tabela 23 – Anexo I**) e amplificada com *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus* possibilitou a obtenção de perfil completo, no entanto, quando extraída pelo *kit DNA IQ System* (amostra 1141 - **Tabela 23 – Anexo I**) possibilitou apenas a obtenção de material extraído com quantidade suficiente para ser amplificado com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Tabela 21 – Anexo I**) tendo-se obtido um perfil completo. Os resultados obtidos para a amostra 979 podem ser explicados pelo facto de a purificação com *Microcon*[®] e NaOH permitir neutralizar os inibidores existentes na amostra, o mesmo não se tendo passado para as amostras 1033 e 1141.

Das amostras referidas anteriormente apenas foi possível amplificar a amostra 200 para o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* cujas condições de amplificação e aplicação se encontram reunidas na **Tabela 25**. Esta amostra continuou a apresentar um perfil parcial, permitindo sugerir que se trata de uma amostra com bastantes inibidores presentes (**Figura 36 em Anexo II**).

Tabela 25 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 200 enterrada em solo arenoso com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
200	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	0,5632	28.89	2	1	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

Das amostras anteriormente mencionadas, somente a amostra 904 apresentou um perfil genético individual com o *kit AmpFℓSTR® NGM SElect™*. Na **Tabela 26** encontram-se as condições de amplificação e aplicação para este *kit*. Esta amostra apresentou um perfil completo contribuindo para a hipótese da presença de inibidores (**Figura 37 em Anexo II**), aos quais este *kit* é mais sensível.

Tabela 26 - Condições de amplificação e aplicação da amostra 904 enterrada em solo arenoso com o *kit AmpFℓSTR® NGM SElect™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação NGM SElect* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
904	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	0,2358	29.35	5	1	20	Completo

*Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® NGM SElect™* é 25μl

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfis parciais com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 27**.

Tabela 27 - Condições de amplificação e aplicação de amostras enterradas em solo arenoso com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler (μl)*	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
134	OI	3 dias	<i>Chelex</i>	0,0104	29.87	8 e 10	1	20	Parcial
542	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	0,0168	28.89	10	2	20	Parcial
982	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	0,0327	28.84	10	1	20	Parcial
1028	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	0,0357	27.61	10	1	20	Parcial

* Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

Os perfis genéticos das amostras extraídas por *Chelex* e purificadas com *Microcon®* e NaOH (134 (verão), 982 (inverno)) obtidos após amplificação não se encontraram completos (**Figuras 38 e 39 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições que a amostra 134, quando extraída com recurso ao *kit QIAamp DNA Investigator*, não permitiu a obtenção de quantidade de ADN nuclear para a sua amplificação com nenhum *kit* de amplificação de STRs. Contudo, a mesma amostra quando extraída com o *kit DNA IQ System* (amostra 116 – **Tabela 23 – Anexo I**) permitiu recuperar material suficiente para a sua amplificação com *AmpFℓSTR® MiniFiler™*, apesar de não ter amplificado para nenhum dos marcadores (**Tabela 21 – Anexo I**).

Para os resultados desfavoráveis obtidos com as diferentes metodologias de extração, poderá ter contribuído o facto de se tratar de uma mancha de sangue em licra, uma vez que a crosta de sangue formada à superfície do tecido pode ter sido eliminada. A redução da quantidade de sangue na superfície do tecido terá contribuído para a consequente diminuição da possibilidade da amplificação completa dos alelos de alguns dos marcadores - D7S820, D16S539 e Amelogenina, na amostra 134 (**Figura 38 – Anexo II**).

A amostra 982 não amplificou totalmente para os marcadores D21S11, D7S820, D16S539 e Amelogenina (**Figura 39 – Anexo II**). O resultado obtido para esta amostra poderá ser explicado pela presença de inibidores (ex. resina de pinheiro e sílica), podendo ainda ter contribuído para este fator uma reduzida impregnação da mancha ou a variação no número de células nucleadas existente em 30μl de sangue.

As correspondentes amostras, sujeitas às mesmas condições de degradação do que a amostra 982, extraídas com recurso aos *kits DNA IQ System* (amostra 1144 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e *QIAamp DNA Investigator* (amostra 1036 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e os produtos extraídos amplificados com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* possibilitaram a obtenção de perfis completos, favorecendo a ideia já apresentada da eliminação dos inibidores por estes *kits*.

Os perfis genéticos das amostras 542 (verão) e 1028 (inverno), ambas extraídas por *QIAamp DNA Investigator*, não se encontram completos (**Figura 40 e 41** em **Anexo II**).

A amostra 542 é uma mancha de sangue em licra. A amostra sujeita às mesmas condições ambientais, quando extraída com recurso ao *kit DNA IQ System* (amostra 362 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e o produto extraído amplificado com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* possibilitou a obtenção de perfil completo, no entanto, a amostra correspondente quando extraída por *Chelex* e purificada com *Microcon®* e NaOH (amostra 200 – **Tabela 23** em **Anexo I**), apesar de conter quantidade de produto extraído suficiente para ser amplificado com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*, não possibilitou a obtenção de um perfil completo (**Tabelas 21 e 23 – Anexo I**). Assim, podemos colocar a hipótese de nesta amostra ter sido eliminada a crosta de sangue formada à superfície do tecido, reduzindo a possibilidade da amostra amplificar totalmente para o marcador D13S317 (**Figura 40 – Anexo II**). Poderá ainda colocar-se a hipótese de haver alguns inibidores presentes (ex. resina de pinheiro, sílica), que não tenham sido totalmente removidos durante a extração, apesar de o valor de IPC obtido se encontrar dentro dos valores normais, que se deve muito provavelmente, à utilização de BSA.

A amostra 1028 encontra-se incompleta para os marcadores D2S1338, D16S539 e D21S11 (**Figura 41 – Anexo II**). Esta amostra constitui uma mancha de sangue em ganga, que associada aos inibidores possivelmente presentes no produto extraído (ex. resina de pinheiro e *índigo*), poderá apresentar uma reduzida quantidade de células nucleadas inicial.

A mesma amostra, quando extraída com recurso ao *kits DNA IQ System* (amostra 1136 – **Tabela 23** em **Anexo I**) e o produto extraído amplificado com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* possibilitou a obtenção de um perfil completo, no entanto, quando extraída por *Chelex* seguida de purificação com *Microcon®* e NaOH (amostra 974 – **Tabela 23** em **Anexo I**), apesar de conter material suficiente para a sua amplificação com *AmpFℓSTR® MiniFiler™*, não proporcionou a amplificação de qualquer marcador (**Tabelas 21 e 23 – Anexo I**). Estes resultados corroboram com a hipótese apresentada, de que se trata de amostras com inibidores.

4.4. Amostras colocadas à superfície do solo de um bosque

Analisando e comparando os resultados da quantificação das amostras colocadas à superfície do solo de um bosque durante os primeiros 15 dias nas épocas de verão e inverno, verificou-se que a quantidade de ADN presente nas amostras da época de verão (min. a máx para o *kit QIAamp DNA Investigator*: 0,0116 – 0,3848ng/μl) foi de um modo geral, com os três métodos de extração, ligeiramente inferior à verificada nas amostras colocadas durante a época de inverno (min. a máx para o *kit QIAamp DNA Investigator*: 0,0472 – 8,9641 ng/μl) (**Tabela 28 – Anexo I**). A humidade verificada durante os 15 primeiros dias do período de verão

(**Tabela 29a**) aliada ao calor próprio desta época, terão promovido uma maior degradação do ADN, quando comparada com o mesmo período de tempo no inverno. Verificou-se ainda que apesar da percentagem de humidade relativa ser idêntica em ambas as épocas, a degradação do ADN foi menor durante a época de inverno. Tal facto deveu-se, muito provavelmente, à baixa temperatura própria desta época assim como a reduzida pluviosidade verificada (**Tabela 29b**), que terão contribuído para a conservação do ADN. Após este período, verificou-se uma diminuição menos acentuada da quantidade de ADN durante a época de verão, quando comparada com as amostras colocadas durante a época de inverno, presumivelmente devido à diminuição da percentagem de humidade e aumento da temperatura, que levaram à secagem rápida do tecido (**Tabela 29a**). A partir desta altura, o aumento da temperatura na época de inverno (**Tabela 29b**) juntamente com a humidade e pluviosidade elevadas terão levado ao aumento da atividade bacteriana, e consequente à degradação e remoção do ADN, presente nos diferentes tecidos.

Tabela 29. Variação da temperatura (°C), precipitação (mm) e percentagem de humidade (%) ocorridas em Coimbra, desde 3 dias antes da colocação das amostras em solo arenoso até 3 meses após a sua colocação durante a época de verão (**a**) e até 30 dias durante o inverno (**b**).

a) As amostras foram colocadas no dia 30.06.2009 (verão):

	27.06.09 – 29.06.09 (3 dias antes da colocação)	30.06.09 (colocação)	01.07.09 (1 dia) a 03.07.09 (3 dias)	04.07.09 a 07.07.09 (7 dias)	08.07.09 a 15.07.09 (15 dias)	16.07.09 a 30.07.09 (30 dias)	31.07.09 a 28.09.09 (3 meses)
Precipitação (mm)	17,8mm	0,1mm	0,3mm	1,3mm	1,4mm	27,2mm	22,9mm
Temp min (°C)	12,5°C	18,5°C	15°C	13,5°C	12,5°C	11,5°C	10,5°C
Temp max (°C)	27,5°C	26,5°C	26,5°C	25°C	29°C	35,5°C	37,5°C
Humidade min (%)	39%	60%	62%	48%	40%	30%	5%
Humidade max (%)	97%	92%	97%	98%	98%	98%	98%

Variação da temperatura entre 16.07.2009 e 30.07.2009: de 17.07.2009 a 19.07.2009 houve um aumento brusco de temperatura: a temperatura mínima passou de 11,5°C para 15,5°C e a máxima de 22,5°C para 35,5°C. Após este período há uma diminuição de temperatura máxima a 22.07.2009, passando esta a ser de 22,5°C. A temperatura mínima subiu para 16,5°C. Posteriormente, ocorre um novo aumento das temperaturas mínimas e máximas.

b) As amostras foram colocadas no dia 06.03.2010 (inverno):

	02.03.10 – 05.03.10 (3 dias antes da colocação)	06.03.10 (colocação)	07.03.10 (1 dia) a 09.03.10 (3 dias)	10.03.10 a 13.03.10 (7 dias)	14.03.10 a 21.03.10 (15 dias)	22.03.10 a 05.04.10 (30 dias)
Precipitação (mm)	0mm	0mm	0mm	0mm	22,5mm	26,1mm
Temp min (°C)	8,5°C	8,5°C	1,5°C	2°C	7,5°C	5°C
Temp max (°C)	17,5°C	13,5°C	14°C	15°C	20°C	21°C
Humidade min (%)	35%	62%	32%	21%	28%	52%
Humidade max (%)	98%	92%	100%	91%	100%	100%

Variação da temperatura entre 22.03.2010 e 05.04.2010: entre 22.03.2010 e 23.03.2010 verificou-se um aumento das temperaturas mínima (8,5°C) e máxima (19°C). Posteriormente ocorreu um aumento da temperatura mínima, atingindo os 12,5°C e uma diminuição da temperatura máxima para 16°C (24.03.2010). A partir desta altura, a temperatura mínima diminuiu para 6°C e a máxima aumentou ligeiramente até aos 17,5°C (28.03.2010). A temperatura mínima voltou a aumentar até aos 10°C e a temperatura máxima diminuiu ligeiramente até aos 15°C (30.03.2010).

Para as amostras de sangue colocadas à superfície do solo de um bosque durante o verão, foi possível obter-se quantidade de ADN suficiente para ter perfis genéticos completos para algumas manchas de sangue em algodão, extraídos pelos diversos métodos até 3 meses (**Figura 42a**). Para as manchas de sangue colocadas durante o inverno foi só possível recuperar quantidade de ADN suficiente para obtenção de perfis genéticos completos em amostras de sangue em licra extraídas com *QIAamp DNA Investigator* e *DNAIQ System*, até 30 dias (**Figura 42b**).

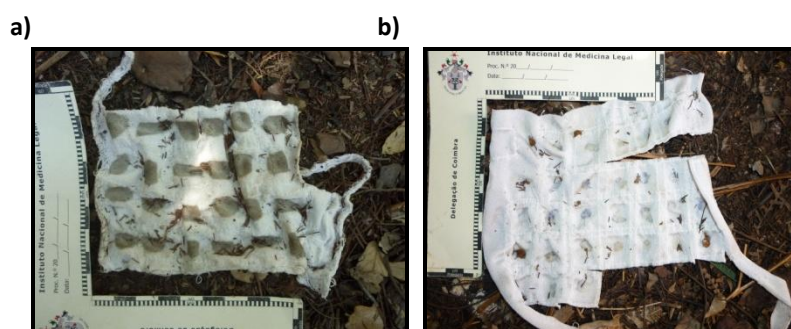


Figura 42. a) Fotografia do tecido de algodão do dador P colocado à superfície do solo de um bosque durante 3 meses no período de verão b) Fotografia do tecido de licra do dador P colocado à superfície do solo de um bosque durante 30 dias no período de inverno.

Do total de amostras analisadas (351), foi possível obter-se material extraído suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® Identifier™* em 203 amostras e destas foi possível

obter um perfil completo em 191 amostras, obteve-se um perfil parcial em dez amostras e duas amostras não apresentaram amplificação dos marcadores. Foi ainda possível obter-se material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* em 29 amostras. Destas, apenas uma não proporcionou a amplificação dos marcadores, tendo as restantes originado um perfil completo (**Tabelas 28 e 30 - Anexo I**).

Ao analisar a **Tabela 30 (Anexo I)** verifica-se que para a época de verão foram obtidas um total de 88 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* enquanto que na época de inverno foram obtidos 103 perfis genéticos completos. Pode ainda verificar-se que para a época de verão foram obtidas um total de 26 amostras com perfil completo para o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* enquanto que na época de inverno foram obtidos apenas 7 perfis genéticos completos.

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfis parciais com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 31**. Estas amostras terão a presença de inibidores no produto extraído e/ou alguma degradação. Em algumas amostras poderá ainda ocorrer inibição da amplificação por excesso de material, fator que reduz a possibilidade da amplificação completa dos alelos de alguns dos marcadores de menor tamanho.

Tabela 31 - Condições de amplificação e aplicação de amostras colocadas à superfície do solo de um bosque com os *kits AmpFℓSTR® Identifiler™* e *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Identifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
407	NI	7 dias	Chelex	0,1882	28.90	3 ^a e 4 ^a , 7 ^b e 10 ^b	4	20	Parcial
410	PI	7 dias	Chelex	0,1358	29.01	3 ^a , 5 ^a , 8 ^b e 10 ^b	4	20	Parcial
413	OI	7 dias	Chelex	0,5901	28.03	1 ^a e 2 ^b	4	20	Parcial
416	NI	15 dias	Chelex	0,1825	27.59	3 ^a , 4 ^a , 6 ^b e 10 ^b	4	20	Parcial
418	Pg	15 dias	Chelex	0,1127	29.89	4 ^a , 5 ^a e 10 ^b	4	20	Parcial
420	Pa	15 dias	Chelex	0,2931	28.57	3 ^a 5 ^b , 6 ^b	4	20	Parcial
486	Oa	7 dias	DNAIQ	0,4784	28.99	1 ^a , 2 ^a , 3 ^a , 3 ^b e 4 ^b	4	20	Parcial
612	Oa	7 dias	QIAamp	0,1316	28.81	10 ^b	4	20	Parcial
699	Pa	30 dias	Chelex	0,1059	28.84	10 ^b	1	20	Parcial
973	Oa	3 dias	Chelex	0,2471	27.61	3 ^b e 6 ^b	3	20	Parcial

*a – amostras amplificadas com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* cujo volume final da reação é 12,5μl e

*b- amostras amplificadas com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* cujo volume final da reação é 25μl.

Os perfis genéticos das amostras 410, 418 (verão) e 973 (inverno) extraídas por *Chelex*, obtidos após amplificação não se encontraram completos para alguns marcadores de maior tamanho (**Figuras 43, 44 e 45, 46 e 47 em Anexo II**).

As amostras sujeitas às mesmas condições que as amostras 410, 418 e 973, extraídas com os *kits QIAamp DNA Investigator* e *DNA IQ System* possibilitaram a obtenção de perfis genéticos completos, quando amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifiler™* ou com *AmpFℓSTR®*

Identifiler™ Plus, colaborando com a hipótese de se tratarem de amostras com alguns inibidores presentes, uma vez que estes métodos possibilitam a purificação das amostras.

O perfil genético da amostra 416 (verão) extraída por *Chelex*, obtido após amplificação não se encontrou completo para o marcador D16S539 (**Figura 48 em Anexo II**).

A mesma amostra, quando extraída com recurso ao *kit DNA IQ System* (amostra 488 - **Tabela 30 – em Anexo I**) e amplificada com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* permitiu obter um perfil completo, no entanto quando extraída com o *kit QIAamp DNA Investigator* (amostra 614 - **Tabela 30 – em Anexo I**), apesar de conter material suficiente para ser amplificada com *AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Tabela 28 - Anexo I**), não permitiu a obtenção de qualquer perfil, o que poderá indicar a presença de ADN degradado.

Os perfis genéticos das amostras 486 e 612 (verão), sujeitas às mesmas condições durante o mesmo período de tempo, foram extraídas pelos *kits DNA IQ System* e *QIAamp DNA Investigator*, respetivamente. Após amplificação, os seus perfis genéticos não se encontraram completos para alguns marcadores de menor e maior tamanho no caso da amostra 486, e apenas o marcador D2S1338 para a amostra 612 (**Figuras 49 e 50 em Anexo II**).

A amostra sujeita às mesmas condições durante o mesmo período temporal, extraída com *Chelex* (amostra 414 – **Tabela 30 em Anexo I**) e amplificada com *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* permitiu a obtenção de um perfil completo. Tal facto pode dever-se à presença de material muito concentrado na amostra 486 após a extração com o *DNA IQ System*, que poderá ter inibido a amplificação destes marcadores. A amostra 612 poderá conter no produto extraído, alguns inibidores que não foram removidos durante a extração e que poderão ter inibido a amplificação desse marcador.

Os perfis genéticos das amostras 407, 413, 420 e 699 (verão) extraídas por *Chelex*, e obtidos após amplificação não se encontraram completos para alguns dos alelos dos marcadores de maior tamanho (**Figuras 51 – 56 em Anexo II**).

Estas amostras quando extraídas com os *kits QIAamp DNA Investigator* e *DNA IQ System* possibilitaram a obtenção de perfis completos, quando amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifiler™* e/ou *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*, exceto a amostra correspondente à amostra 699, que só permitiu a recuperação de ADN suficiente para a sua amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*, quando extraída com o *kit QIAamp DNA Investigator* (amostra 735 - **Tabela 30 em Anexo I**) tendo resultado num perfil completo (**Tabela 28 – Anexo I**).

As amostras 407, 413, 420 e 699, quando amplificadas com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* possibilitaram a obtenção de perfis genéticos completos (**Figuras 57 a 60 - Anexo II**). Tal evidência reforça a hipótese de estarmos perante amostras com alguma degradação e/ou inibidores presentes.

As condições de amplificação e aplicação destas amostras encontram-se reunidas na **Tabela 32**.

Tabela 32 - Condições de amplificação e aplicação das amostras colocadas à superfície do solo de um bosque com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
407	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	0,1882	28.90	10	1	20	Completo
413	Ol	7 dias	<i>Chelex</i>	0,5901	28.03	2	1	20	Completo
420	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	0,2931	28.57	4	1	20	Completo
699	Pa	30 dias	<i>Chelex</i>	0,1059	28.84	9	1	20	Completo

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

4.5. Amostras colocadas num poço

Para as amostras colocadas dentro de um poço foram efetuadas 81 extrações, não tendo sido possível recuperar em nenhuma das amostras, quantidade de ADN nuclear suficiente para amplificar com qualquer um dos kits de STRs (**Tabela 33 – Anexo I**), não se tendo obtido assim qualquer perfil genético dos indivíduos em estudo. O poço mostrou ser o ambiente em que mais rapidamente o ADN das amostras foi destruído/removido, impedindo a possibilidade de obtenção de perfis genéticos de uma amostra sujeita às condições de degradação referidas, mesmo durante um curto período de tempo (24 horas) (**Figura 61**).

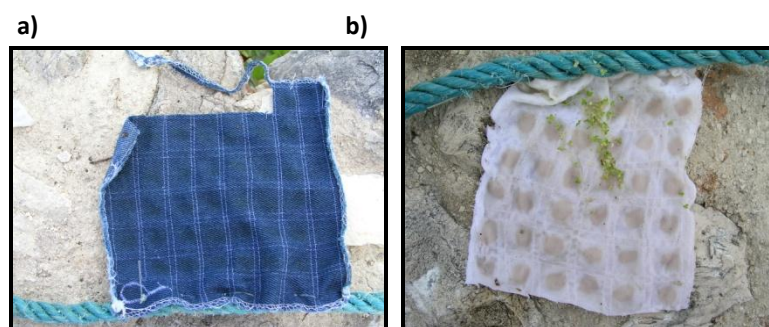


Figura 61. Fotografias dos tecidos a) ganga e b) algodão, do dador P colocados dentro de um poço durante 1 dia.

4.6. Amostras colocadas dentro de uma habitação

Analisando os resultados da quantificação de ADN das 243 amostras colocadas dentro de uma habitação (**Tabela 34 – Anexo I**), verificou-se que a quantidade de ADN manteve-se relativamente estável ao longo dos 24 meses. Parece ter havido um ligeiro decréscimo na quantidade de ADN entre a primeira colheita e a dos 7 dias, muito provavelmente devido à variação da percentagem de humidade e temperatura registada (**Tabela 35**) mantendo-se novamente estável ao longo do restante tempo. A variação verificada na quantidade ADN entre as diversas colheitas era espectável, uma vez que o número de células nucleadas existente em 30μl de sangue é variável.

Tabela 35. Variação da temperatura (°C) e humidade (%) ocorridas dentro da habitação durante 2 anos.

	01.07.09 (1 dia) a 03.07.09 (3 dias)	04.07.09 a 07.07.09 (7 dias)	08.07.09 a 15.07.09 (15 dias)	16.07.09 a 30.07.09 (30 dias)	31.07.09 a 28.09.09 (3 meses)	29.09.09 a 26.12.09 (6 meses)	27.12.09 a 01.07.10 (12 meses)	01.01.10 a 01.07.11 (24 meses)
Humidade min (%)	67%	43%	40%	75%	29%	15%	10%	13%
Humidade max (%)	72%	71%	66%	87%	65%	84%	72%	80%
Temp min (°C)	21°C	19,6°C	19,6°C	19,7°C	18,7°C	11°C	19°C	18°C
Temp max (°C)	22,4°C	23,7°C	24,9°C	29°C	29°C	28°C	37°C	30°C

Para as amostras de sangue colocadas dentro de uma habitação, foi possível obter-se perfis genéticos completos para maioria das manchas de sangue nos três tipos de tecido, extraídos pelos diversos métodos até ao fim de 24 meses.

Da totalidade de amostras quantificadas (243), foi possível obter-se ADN nuclear suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* em 233 amostras, tendo-se obtido perfis completos em 223 amostras. Das restantes dez amostras, em quatro obteve-se um perfil parcial, cinco não apresentaram amplificação dos marcadores e uma encontrava-se contaminada. Foi ainda possível obter-se material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* em dez amostras, tendo-se obtido um perfil completo em sete (**Tabelas 34 e 36 – Anexo I**) e uma não apresentou amplificação dos marcadores. As restantes duas amostras (amostras 168 e 1508), apesar de conterem material extraído suficiente para amplificar com este *kit*, a sua amplificação foi testada com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* / *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* tendo-se obtido perfis completos.

As 6 amostras que não possibilitaram a obtenção de qualquer perfil genético com nenhum dos *kits* de STRs testados, pertencem aos três indivíduos, foram extraídas pelos três métodos e são de colheitas diversas ao longo dos 24 meses. A quantidade de ADN obtida em cinco das amostras era suficiente para a obtenção de perfis completos com *AmpFℓSTR® Identifiler™* e apenas uma apresentava material extraído suficiente para a sua amplificação com *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

O facto de não se ter obtido qualquer perfil, pode dever-se a características intrínsecas à própria amostra ou resultar da presença de inibidores.

As condições de amplificação e aplicação para as amostras que apresentaram perfis parciais com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 37**. Poderão tratar-se de amostras que apresentam, em conjunto com o produto extraído, inibidores que impediram a amplificação dos alelos de alguns dos marcadores de maior tamanho.

Tabela 37 - Condições de amplificação com os kits *AmpFℓSTR® Identifiler™* e *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* e aplicação de amostras colocadas dentro de uma habitação.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Identifiler (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
155	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	0,1423	28.90	1 ^a , 3 ^a e 5 ^a , 9 ^b e 10 ^b	3	20	Parcial
183	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	0,1227	29.75	4 ^a e 5 ^a	4	20	Parcial
186	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	0,1445	32.08	1 ^a , 4 ^a e 5 ^a , 10 ^b	4	20	Parcial
559	Ng	6 meses	<i>DNAIQ</i>	0,1574	28.82	3 ^a e 5 ^a , 6 ^b e 10 ^b	4	20	Parcial

a – amostras amplificadas com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™* cujo volume final da reação é 12,5μl e b – amostras amplificadas com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* cujo volume final da reação é 25μl.

Os perfis genéticos das amostras 155 e 186 extraídas por *Chelex*, obtidos após amplificação, não se encontraram completos para o marcador D18S51 (**Figuras 62 e 63 em Anexo II**).

As amostras colocadas durante o mesmo período de tempo e extraídas com os kits *QIAamp DNA Investigator* e *DNA IQ System* possibilitaram a obtenção de perfis completos, quando amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifiler™* e *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus* (**Tabela 36 – Anexo I**), corroborando a hipótese acima apresentada.

Os perfis genéticos das amostras 183 e 559, extraídos por *Chelex* e *DNA IQ System*, respetivamente, obtidos após amplificação, não se encontraram completos nos marcadores de maior tamanho (**Figuras 64 e 65 em Anexo II**).

As mesmas amostras quando extraídas pelos outros métodos possibilitaram a obtenção de perfis completos, quando amplificadas com o mesmo kit de amplificação (**Tabela 36 – Anexo I**).

Para as amostras 183 e 559, foi ainda possível completar o perfil ao recorrer ao kit de amplificação *AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Figuras 66 e 67 em Anexo II**). Tal facto potencia a evidência de que estamos perante amostras com alguns fatores de inibição.

As condições de amplificação e aplicação para estas amostras estão apresentadas na **Tabela 38**.

Tabela 38 - Condições de amplificação e aplicação das amostras 183 e 559 colocadas numa habitação com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
183	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	0,1227	29.75	4	1	20	Completo
559	Ng	6 meses	<i>DNAIQ</i>	0,1574	28.82	4	1	20	Completo

*Volume final da reação de amplificação com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

4.7. Amostras sujeitas a lavagem com detergente

Das 54 amostras de sangue lavadas com detergente e extraídas com os diferentes métodos, a maioria possibilitou a obtenção de perfis genéticos completos (mesmo após a segunda lavagem). A licra foi o tecido que nem sempre proporcionou a recuperação de quantidade de ADN extraída suficiente para ser amplificado (**Tabela 39 – Anexo I**).

A lavagem com detergente (marca SKIP) não mostrou ser muito eficaz na remoção do ADN das amostras, talvez devido à sua constituição não ser a adequada para este efeito ou por as manchas de sangue terem ficado demasiado tempo à temperatura ambiente até à sua lavagem (2 meses), o que levou a que as células sanguíneas ficassem retidas nas fibras do tecido dificultando a sua libertação a 30°C mesmo durante 1 hora e 30 minutos de lavagem.

Das amostras analisadas, foi possível obter-se material extraído suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* em 48 amostras, 47 amostras resultaram num perfil completo e apenas uma não apresentou amplificação dos marcadores. Foi possível obter ainda em 4 amostras, material extraído suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*, em três das quais obteve-se um perfil completo e uma apresentou um perfil parcial (**Tabelas 39 e 40 – Anexo I**).

As condições de amplificação e aplicação para a amostra que apresentou um perfil parcial com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* encontram-se reunidas na **Tabela 41**.

Tabela 41 - Condições de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* e aplicação da amostra 1407 lavada com detergente 2ª vez.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Quantificação (ng/μl)	IPC	Amplificação Minifiler* (μl)	Aplicação (μl)	Tempo de injeção (s)	Perfil
1407	NI	2ª	DNAIQ	0,0123	28.39	10	1	20	Parcial

*Volume final da reação de amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* é 25μl

O perfil genético da amostra 1407 extraída por *DNA IQ System*, obtido após amplificação, não se encontrou completo para os marcadores D21S11, D13S317 e D7S820 (**Figura 68 em Anexo II**).

A mesma amostra quando extraída com recurso ao *kit QIAamp DNA Investigator* (amostra 1425 - **Tabela 40 - Anexo I**) e o produto extraído amplificado com *AmpFℓSTR® Identifiler™* possibilitou a obtenção de perfil completo, no entanto a amostra quando extraída por *Chelex* não possibilitou a obtenção de quantidade de material suficiente para a sua amplificação por nenhum *kit* de amplificação de STRs (**Tabela 39 - Anexo I**).

O facto de se tratar de uma mancha de sangue em licra pode ajudar a explicar os resultados obtidos, como já foi descrito anteriormente para outras amostras no mesmo tipo de suporte.

4.8. Amostras sujeitas a lavagem com lixívia

Na maioria das 54 amostras de sangue lavadas com lixívia, não foi possível obter-se quantidade suficiente de ADN nuclear extraído para a sua amplificação (**Tabela 42 – Anexo I**). O único tecido que possibilitou a obtenção de perfis genéticos completos quando extraídos por qualquer um dos métodos foi a ganga (após a primeira lavagem). A ganga apresenta uma matriz na sua constituição que pode levar a uma maior retenção das células sanguíneas, dificultando a destruição das mesmas pelo hipoclorito de sódio.

O hipoclorito de sódio degrada o ADN através da oxidação das ligações de hidrogénio existentes, por modificações introduzidas nas bases nucleotídicas, o que leva à formação de produtos cloridratos, promovendo assim a desnaturação das cadeias e degradação do ADN (Kemp and Smith, 2005).

Das 54 amostras quantificadas, foi apenas possível obter-se material suficiente para a amplificação com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™* (**Tabela 42 – Anexo I**) em 5 amostras, quatro amostras resultaram num perfil completo e uma não apresentou amplificação dos marcadores (**Tabela 43 – Anexo I**), o que corrobora estarmos perante amostras com ADN degradado.

4.9. Considerações gerais

O algodão foi o suporte que, no geral, permitiu a obtenção de um maior número de perfis genéticos completos, quando a amostra continha ADN suficiente para ser amplificado.

A ganga e a licra mostraram ser suportes mais problemáticos. A ganga, possivelmente por ser corada com *índigo* azul, comprovadamente um inibidor da PCR. A licra por ser um material sintético que não absorve completamente o sangue, provocando a formação de crostas facilmente removidas pelo próprio manuseamento do suporte, resultando na perda do material biológico.

No solo pantanoso verificou-se uma maior degradação do ADN presente nas amostras, assim como do próprio suporte, quando comparado com os restantes tipos de solo. Este é um solo quimicamente ácido, rico em cofatores de nucleases que degradam o ADN. É um solo muito húmido que na presença de calor leva a uma elevada proliferação bacteriana que, consequentemente, conduz à libertação de nucleases que degradam o ADN. É um solo rico em ácidos húmicos, também comprovadamente inibidores da PCR.

No solo argiloso, solo rico em ácidos húmicos, a degradação verificada variou consideravelmente com as alterações da temperatura e humidade. Este é um solo igualmente ácido, rico em cofatores de nucleases que degradam o ADN. É um solo compacto, retém humidade que na presença de calor leva à proliferação bacteriana e à degradação do ADN pelas nucleases libertadas. Estes fatores ajudam a explicar a degradação rápida do ADN verificada no verão, quando comparada com o mesmo período temporal de permanência das amostras na época de inverno.

O solo arenoso conservou melhor o material biológico, devido à baixa humidade e reduzida proliferação microbiana. Em contrapartida, promoveu a lavagem do material biológico na presença de pluviosidade. Trata-se de um solo pouco ácido, menos rico em cofatores de nucleases que degradam o ADN, quando comparado com os restantes solos. É muito pouco compacto, devido a sua constituição, sendo por isso muito permeável o que promove o arejamento do solo na presença de calor, mas também a permeabilidade à chuva.

A superfície do solo do bosque foi o ambiente que possibilitou a conservação das amostras durante mais tempo na época de inverno, provavelmente devido à baixa pluviosidade verificada no intervalo de tempo de permanência das amostras.

Este foi o ambiente que originou um maior número de perfis genéticos incompletos em amostras amplificadas com *AmpFℓSTR® Identifier™*, apesar de conterem quantidade de ADN suficiente para proporcionar perfis completos. Tal facto pode dever-se à presença de inibidores inespecíficos da PCR.

O poço mostrou ser um ambiente muito desfavorável, levando à remoção rápida do material biológico, impedindo a identificação genética das amostras num período de apenas 24 horas.

As amostras colocadas dentro de uma habitação conservaram-se durante um período de 24 meses, permitindo a identificação genética completa da maioria das amostras, provavelmente devido à reduzida variação de amplitude da temperatura e humidade verificada durante o período de tempo em que permaneceram neste ambiente.

Este ambiente apresentou algumas amostras nas quais não foi possível obter qualquer perfil genético com nenhum dos *kits* de STRs testados, apesar de terem quantidade de ADN suficiente para a obtenção de perfis completos com *AmpFℓSTR® Identifier™* ou *AmpFℓSTR® MiniFiler™*. Não foi encontrada uma explicação cabal para esta ocorrência.

A lavagem com o detergente SKIP do suporte contendo o material biológico, não removeu totalmente o ADN presente nas amostras mesmo após a segunda lavagem, permitindo, deste modo, a identificação genética completa da maioria das amostras.

As razões desta constatação podem prender-se com o facto da constituição do detergente não ser a adequada para a remoção de sangue de tecidos e/ou pelas manchas de sangue terem permanecido demasiado tempo à temperatura ambiente até a sua lavagem (2 meses). Esta última circunstância pode ter contribuído para que as células sanguíneas ficassem presas às fibras do tecido, dificultando a sua libertação mesmo a 30°C durante 1 hora e 30 minutos de lavagem.

A lavagem com lixívia levou à degradação total do material biológico no fim da 2ª lavagem, não permitindo a identificação genética da maioria das amostras.

Esta situação pode ter resultado do hipoclorito de sódio degradar o ADN através da oxidação das ligações de hidrogénio, por modificações introduzidas nas bases nucleotídicas o que leva à formação de produtos cloridratos. Esta circunstância promove a desnaturação das cadeias e degradação do ADN.

O *QIAamp DNA Investigator* (QIAGEN) demonstrou ser um *kit* de extração muito versátil e eficaz na remoção de vários tipos de inibidores da PCR, sendo que o protocolo é simples e fácil de usar. A referida remoção ocorre devido à utilização de colunas de centrifugação para promover a purificação e recuperação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN, mesmo na presença de inibidores da PCR.

O *kit DNA IQ System* (Promega) não demonstrou ser tão eficaz como o *QIAamp DNA Investigator*, permitindo, no entanto, a purificação e recuperação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN.

A alteração na composição do buffer de lavagem do *DNA IQ System* aumentou a eficácia na remoção de inibidores e reduziu a perda de ADN durante o passo de lavagem, o que constitui uma inovação ao protocolo estabelecido.

O método de extração que recorre à resina quelante *Chelex* permite a obtenção de uma quantidade razoável de ADN, de um modo simples, rápido e económico. Neste estudo, demonstrou ser pouco eficaz na remoção de inibidores da PCR. Contudo, a purificação do produto extraído com colunas *Microcon*[®]/*Amicon*[®] e hidróxido de sódio, permitiu uma eficaz neutralização da resina de pinheiro presente em algumas amostras, uma vez que o solo arenoso encontrava-se inserido num pinhal.

5. Conclusões

Conclusões

1ª O algodão foi o suporte que, no geral, permitiu a obtenção de um maior número de perfis genéticos completos, quando a amostra continha ADN suficiente para ser amplificado.

A ganga e a licra mostraram ser suportes mais problemáticos.

2ª No solo pantanoso verificou-se uma maior degradação do ADN presente nas amostras, assim como do próprio suporte, quando comparado com os restantes tipos de solo.

3ª No solo argiloso, a degradação verificada variou consideravelmente com as alterações da temperatura e humidade.

4ª O solo arenoso conservou melhor o material biológico, devido à baixa humidade e reduzida proliferação microbiana. Em contrapartida, promoveu a lavagem do material biológico na presença de pluviosidade.

5ª A superfície do solo do bosque foi o ambiente que possibilitou a conservação das amostras durante mais tempo na época de inverno.

6ª O poço mostrou ser um ambiente muito desfavorável, levando à remoção rápida do material biológico.

7ª As amostras colocadas dentro de uma habitação conservaram-se durante um período de 24 meses, permitindo a identificação genética completa da maioria das amostras.

8ª A lavagem com o detergente SKIP do suporte contendo o material biológico, não removeu totalmente o ADN presente nas amostras mesmo após a segunda lavagem, permitindo, deste modo, a identificação genética completa da maioria das amostras.

9ª A lavagem com lixívia levou à degradação total do material biológico no fim da segunda lavagem, não permitindo a identificação genética da maioria das amostras.

10ª O *QIAamp DNA Investigator* (QIAGEN) demonstrou ser um *kit* de extração muito versátil e eficaz na remoção de vários tipos de inibidores da PCR.

11ª O *kit DNA IQ System* (Promega) não demonstrou ser tão eficaz como o *QIAamp DNA Investigator*, permitindo, no entanto, a purificação e recuperação de amostras biológicas com baixa quantidade de ADN.

A alteração na composição do buffer de lavagem do *DNA IQ System* aumentou a eficácia na remoção de inibidores e reduziu a perda de ADN durante o passo de lavagem, o que constitui uma inovação ao protocolo estabelecido.

12^a O método de extração que recorre à resina quelante *Chelex* permite a obtenção de uma quantidade razoável de ADN, de um modo simples, rápido e económico. Neste estudo, demonstrou ser pouco eficaz na remoção de inibidores da PCR. Contudo, a purificação do produto extraído com colunas *Microcon*®/*Amicon*® e hidróxido de sódio, permitiu uma eficaz neutralização da resina de pinheiro presente em algumas amostras, uma vez que o solo arenoso se encontrava inserido num pinhal.

6. Bibliografia

Bibliografia

- ABBOTT. 2010. *Phases of a traditional real-time PCR curve* [Online]. Available: <http://www.abbottmolecular.com/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html> [Accessed 07 Dez 2012].
- ALAEDDINI, R., WALSH, S. J. & ABBAS, A. 2010. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review. *Forensic Sci Int Genet*, 4, 148-57.
- ANKER, R., STEINBRUECK, T. & DONIS-KELLER, H. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet*, 1, 137.
- ASURAGEN. 2010. *Taqman* [Online]. Available: http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx [Accessed 07 Dez 2012].
- BAR, W., KRATZER, A., MACHLER, M. & SCHMID, W. 1988. Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int*, 39, 59-70.
- BIOSYSTEMS, A. 2001. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit User's Guide.
- BIOSYSTEMS, A. 2007a. AmpFSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User's Guide.
- BIOSYSTEMS, A. 2007b. Quantifiler® Kits
- Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit User's Manual.
- BIOSYSTEMS, A. 2010. PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits User's Guide.
- BIOSYSTEMS, A. 2011a. AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User's Guide.
- BIOSYSTEMS, A. 2011b. AmpFISTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit User's Guide.
- BLUM, S. A. E., LORENZ, M. G. & WACKERNAGEL, W. 1997. Mechanism of Retarded DNA Degradation and Prokaryotic Origin of DNases in Nonsterile Soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 513-521.
- BOURKE, M. T., SCHERCZINGER, C. A., LADD, C. & LEE, H. C. 1999. NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase. *J Forensic Sci*, 44, 1046-50.
- BUDOWLE, B., HOBSON, D., SMERICK, J., SMITH, J. Year 2001. LOW COPY NUMBER - CONSIDERATION AND CAUTION. In: PROMEGA, ed. Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Identification
- BUTLER, J. M. 2005. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of Str Markers*, Elsevier Academic Press.
- BUTLER, J. M. 2009. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press.
- BUTLER, J. M. 2012. *Advanced topics in forensic DNA typing methodology*, San Diego, CA :, Elsevier Academic Press.
- BUTLER, J. M., SHEN, Y. & MCCORD, B. R. 2003. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci*, 48, 1054-64.
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *ATA37D06.40596* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *G00-366-431* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA3F03.512* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA7G07.37564* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA7G10.415* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA8F03.505* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].

- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA11C06.715* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA11H08.731* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GATA44E05.40831* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GCAA2A03.135* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER -. *GGAA3A09.31762* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER-. *GATA7G10.415* [Online]. Available: <http://www.chlc.org> [Accessed 07 Dez 2012].
- COMEY, C. T., KOONS, B. W., PRESLEY, K. W., SMERICK, J. B., SOBIERALSKI C.A., STANLEY, D. M. & BAECHEL, F. S. 1994. DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 1254-1269.
- CONE, R. W. & FAIRFAX, M. R. 1993. Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination. *PCR Methods Appl*, 3, S15-7.
- EUN, H. M. 1996. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Acad. Press.
- FINDLAY, I., TAYLOR, A., QUIRKE, P., FRAZIER, R. & URQUHART, A. 1997. DNA fingerprinting from single cells. *Nature*, 389, 555-556.
- GIACOMONI, P. U. 2007. *Biophysical and Physiological Effects of Solar Radiation on Human Skin*, RSC Pub.
- GILL P FAU - FEREDAY, L., FEREDAY L FAU - MORLING, N., MORLING N FAU - SCHNEIDER, P. M. & SCHNEIDER, P. M. 2006. The evolution of DNA databases--recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International*, 156, 242-244.
- GILL, P., JEFFREYS, A. J. & WERRETT, D. J. 1985. Forensic application of DNA fingerprints. *Nature*, 318, 577-579.
- GILL, P. & KIRKHAM, A. 2004. Development of a simulation model to assess the impact of contamination in casework using STRs. *J Forensic Sci*, 49, 485-91.
- GILL, P., WHITAKER, J., FLAXMAN, C., BROWN, N. & BUCKLETON, J. 2000. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int*, 112, 17-40.
- GREAVES, M. P. & WILSON, M. J. 1969. The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 317-323.
- GREENSPOON, S. A., SCARPETTA, M. A., DRAYTON, M. L. & TUREK, S. A. 1998. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci*, 43, 1024-30.
- GUSMÃO FILHO, J. D. A. 2002. *Solos da formação geológica ao uso na engenharia*, Recife, UFPE.
- HALL, A. & BALLANTYNE, J. 2004. Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Anal Bioanal Chem*, 380, 72-83.
- HAMMOND, H. A., JIN, L., ZHONG, Y., CASKEY, C. T. & CHAKRABORTY, R. 1994. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet*, 55, 175-89.
- HASHIYADA, M. 2011. "DNA amplification with polymerase chain reaction (PCR)" [Online]. DNA biometrics, Biometrics, Jucheng Yang (Ed.),. Available: <http://www.intechopen.com/books/biometrics/dna-biometrics> [Accessed].
- HOFF-OLSEN, P., MEVAG, B., STAALSTROM, E., HOVDE, B., EGELAND, T. & OLAISEN, B. 1999. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci Int*, 105, 171-83.
- JEFFREYS, A. J., WILSON, V. & THEIN, S. L. 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, 316, 76-79.

- JIANG, A. L., CHENG, Y., LI, J. & ZHANG, W. 2008. A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cells of rice. *J Plant Physiol*, 165, 1134-41.
- JOHN B. SULLIVAN, J. & KRIEGER, J. B. S. G. R. 2001. *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, 2e, Lippincott Williams & Wilkins.
- KEMP, B. M. & SMITH, D. G. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int*, 154, 53-61.
- KIMPTON, C., WALTON, A. & GILL, P. 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet*, 1, 287.
- KREADER, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1102-6.
- LAHIRI, D. K., BYE, S., NURNBERGER, J. I., JR., HODES, M. E. & CRISP, M. 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods*, 25, 193-205.
- LAKAY, F. M., BOTHA, A. & PRIOR, B. A. 2007. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol*, 102, 265-73.
- LENGELER, J., DREWS, G. & SCHLEGEL, H. 2009. *Biology of the Prokaryotes*, Wiley.
- LEVY-BOOTH, D. J., CAMPBELL, R. G., GULDEN, R. H., HART, M. M., POWELL, J. R., KLIRONOMOS, J. N., PAULS, K. P., SWANTON, C. J., TREVORS, J. T. & DUNFIELD, K. E. 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2977-2991.
- LI, H., SCHMIDT, L., WEI, M. H., HUSTAD, T., LERMAN, M. I., ZBAR, B. & TORY, K. 1993. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352; D3S1358; D3S1359. *Hum Mol Genet*, 2, 1327.
- LINDAHL, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-15.
- LIVERMORE, C. V., JOEL. 2009. *Graph showing temperature cycling for a typical PCR protocol*. [Online]. MIT OpenCourseWare. Available: <http://www.flickr.com/photos/mitopencourseware/3503865923/> [Accessed].
- LORENZ, M. G. & WACKERNAGEL, W. 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl Environ Microbiol*, 53, 2948-52.
- MATOS FERNANDES, M. D. 2006. *Mecânica dos solos : conceitos e princípios fundamentais*, Porto, FEUP.
- MELGAR, E., GOLDTHWAIT, D. A. & UKSTINS, W. T. T. A. O. I. 1968. Deoxyribonucleic Acid Nucleases. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 4409-4416.
- MILLS, K. A., EVEN, D. & MURRAY, J. C. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum Mol Genet*, 1, 779.
- O'REILLY, D. M. 2008. *The Law Office of Dennis Michael O'Reilly* [Online]. Sacramento. Available: <http://dnalawpractice.com/forensic-dna.aspx> [Accessed].
- OPEL, K. L., CHUNG, D. & MCCORD, B. R. 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR*,†. *Journal of Forensic Sciences*, 55, 25-33.
- PINHEIRO, M. F. T. 2008. *CSI Criminal*, Edições Universidade Fernando Pessoa
- POLYMERPOULOS, M. H., RATH, D. S., XIAO, H. & MERRIL, C. R. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Res*, 20, 1432.
- POLYMERPOULOS, M. H., XIAO, H., RATH, D. S. & MERRIL, C. R. 1991. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res*, 19, 3753.
- PROMEGA 2006. DNA IQ™ System—Small Sample Casework Protocol.
- QIAGEN 2007. QIAamp® DNA Investigator Handbook.

- ROMANOWSKI, G., LORENZ, M. G. & WACKERNAGEL, W. 1991. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl Environ Microbiol*, 57, 1057-61.
- SHARMA, V. & LITT, M. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol Genet*, 1, 67.
- SINHA, R. P. & HADER, D. P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*, 1, 225-36.
- STRAUB, R. E., SPEER, M. C., LUO, Y., ROJAS, K., OVERHAUSER, J., OTT, J. & GILLIAM, T. C. 1993. A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18. *Genomics*, 15, 48-56.
- STROM, C. M. & RECHITSKY, S. 1998. Use of nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood. *J Forensic Sci*, 43, 696-700.
- SWANGO, K. L., TIMKEN, M. D., CHONG, M. D. & BUONCRISTIANI, M. R. 2006. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Sci Int*, 158, 14-26.
- VINCENT T DEVITA, J. M. D., LAWRENCE, T. S. & STEVEN A ROSENBERG, M. D. 2008. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A. & HIGUCHI, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-13.
- WILLARD, J. M., LEE, D. A. & HOLLAND, M. M. 1998. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol Biol*, 98, 9-18.
- ZHOU, J., BRUNS, M. A. & TIEDJE, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 62, 316-22.

7. Anexos

7.1. Anexo I – Tabelas

Tabela 3 – Número de manchas realizadas para os diferentes indivíduos, tecidos e meios de degradação. Número total de manchas realizadas – 4806.

Meio de Degradação	Dador	Ganga	Licra	Algodão	Total Verão	Total Inverno	Número total de manchas por meio
Solo Pantanoso	<u>N</u>	48	48	48	144	não realizadas	432
	<u>P</u>	48	48	48	144		
	<u>O</u>	48	48	48	144		
	<u>N</u>	48	48	48	144	144	
Solo Argiloso	<u>P</u>	48	48	48	144	144	864
	<u>O</u>	48	48	48	144	144	
	<u>N</u>	48	48	48	144	144	
	<u>P</u>	48	48	48	144	144	
Solo Arenoso	<u>O</u>	48	48	48	144	144	864
	<u>N</u>	54	54	54	162	162	
	<u>P</u>	54	54	54	162	162	
	<u>O</u>	54	54	54	162	162	

Tabela 3 – Continuação

Meio de Degradação	Dador	Ganga	Licra	Algodão	Total	Número total de manchas por meio
Habitação	<u>N</u>	54	54	54	162	486
	<u>P</u>	54	54	54	162	
	<u>O</u>	54	54	54	162	
Lavagem com detergente	<u>N</u>	12	12	12	36	108
	<u>P</u>	12	12	12	36	
	<u>O</u>	12	12	12	36	
Lavagem com lixívia	<u>N</u>	12	12	12	36	108
	<u>P</u>	12	12	12	36	
	<u>O</u>	12	12	12	36	
Poço	<u>N</u>	54	54	54	162	486
	<u>P</u>	54	54	54	162	
	<u>O</u>	54	54	54	162	

Amostra Controle	Dador	Ganga	Licra	Algodão	Total	Número total de manchas para referência
Referência	<u>N</u>	54	54	54	162	486
	<u>P</u>	54	54	54	162	
	<u>O</u>	54	54	54	162	

Tabela 6 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controle positivo /referência para os diferentes marcadores com o *kit* de amplificação *AmpFℓSTR® Identifier™ / AmpFℓSTR® Identifier™ Plus*.

Dador	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	AMEL	D5S818	FGA
<u>N</u>	10, 14	28, 29	8, 12	10	17, 18	6, 9,3	11, 13	13, 14	17, 20	13, 14	16, 17	8, 9	15, 20	X, Y	12, 13	22, 23
<u>P</u>	12, 14	28, 30	11	10, 11	15, 16	9, 9,3	13	9, 11	17, 24	13	14, 17	8, 11	14, 16	X, Y	11	19, 24
<u>Q</u>	11, 14	29, 31.2	10, 12	11, 12	15	6, 9	11, 13	11, 13	17, 18	13, 16	14, 16	8, 11	15	X, Y	11	21

Tabela 7 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controle positivo /referência para os diferentes marcadores com o *kit* de amplificação *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

Dador	D13S317	D7S820	AMEL	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
<u>N</u>	11, 13	8, 12	X, Y	17, 20	28, 29	13, 14	15, 20	10	22, 23
<u>P</u>	13	11	X, Y	17, 24	28, 30	9, 11	14, 16	10, 11	19, 24
<u>Q</u>	11, 13	10, 12	X, Y	17, 18	29, 31.2	11, 13	15	11, 12	21

Tabela 8 – Tipagem das amostras de sangue dos três indivíduos do sexo masculino, utilizadas como controle positivo /referência para os diferentes marcadores com o *kit* de amplificação *AmpFℓSTR® NGM Select™*.

Dador	D10S1248	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL	D8S1179	D21S11	D18S51	D22S1045	D19S433	TH01	FGA	D2S441	D3S1358	D151656	D12S391	SE33
<u>N</u>	15, 16	16, 17	13, 14	17, 20	X, Y	10, 14	28, 29	15, 20	11, 15	13, 14	6, 9,3	22, 23	11, 15	17, 18	11, 12	18, 22	10, 18
<u>P</u>	13, 16	14, 17	9, 11	17, 24	X, Y	12, 14	28, 30	14, 16	16	13	9, 9,3	19, 24	11,3, 13	15, 16	15	21	13, 18
<u>Q</u>	13, 16	14, 16	11, 13	17, 18	X, Y	11, 14	29, 31.2	15	15, 16	13, 16	6, 9	21	11,3, 14	15	15, 16	18, 22	17, 27.2

Tabela 9 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo pantanoso durante a época de verão **a)** extraídas pelo *kit DNA IQ System*, pelo método de *Chelex* e purificadas com *Microcon*[®] e NaOH e pelo *kit QIAamp DNA Investigator*; **b)** extraídas pelo *kit Prepfilier Express* e **c)** extraídas pelo método orgânico. As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

	a)				b)				c)			
	DNA IQ (ng/μl)		Chelex & Purificação NaOH (ng/μl)		Prepfilier (ng/μl)		Orgânica (ng/μl)		Orgânica dil 1/20 (ng/μl)		Orgânica dil 1/30 (ng/μl)	
	IPC		IPC		IPC		IPC		IPC		IPC	
Paul 1 dia	ind	30.99	0,0008	30.53	--	--	ind	ind	0,0022	31.11	--	--
	ind	31.13	ind	30.28	0,0908	27.94	ind	ind	ind	ind	ind	33.98
	ind	31.04	ind	30.17	0,0041	27.68	ind	ind	0,4707	28.16	--	--
	ind	31.04	ind	30.22	--	--	ind	ind	ind	32.04	--	--
	0,0012	30.53	ind	29.71	--	--	ind	ind	ind	ind	ind	30.83
	ind	30.63	ind	30.07	0,0382	28.50	ind	ind	ind	28.59	--	--
	0,0005	30.17	ind	30.22	5,1710	27.06	ind	ind	0,1068	29.38	--	--
	0,0029	30.27	ind	29.90	--	--	ind	ind	0,0262	31.30	--	--
	ind	32.81	ind	30.36	--	--	ind	ind	0,0009	33.06	--	--

Tabela 9 – Continuação

a)

		<i>DNAIQ</i> (ng/μl) IPC		<i>Chelex &</i> <i>Purificação NaOH</i> (ng/μl) IPC		<i>QIAamp</i> <i>Investigator</i> (ng/μl) IPC		<i>Prepfil</i> (ng/μl) IPC	
Paúl 3 dias	Ng	ind	30.78	0,0011	29.79	ind	31.40	0,0015	32.41
	NI	0,0008	30.46	0,0010	29.75	ind	37.30	0,0058	35.03
	Na	0,0037	30.29	0,0014	29.82	0,0050	29.62	--	--
	Pg	0,0017	30.24	ind	30.19	0,0083	33.94	--	--
	PI	0,0018	30.48	0,0032	29.87	0,0031	29.77	--	--
	Pa	0,0087	30.36	0,0025	29.88	ind	29.73	0,0077	35.74
	Og	0,0020	30.17	0,0038	29.75	ind	29.49	0,0127	29.48
	OI	0,0098	29.90	ind	29.50	0,0011	30.46	--	--
	Oa	ind	30.54	ind	30.20	0,0014	30.62	--	--

b)

a)

		<i>DNAIQ</i> (ng/μl) IPC		<i>Chelex &</i> <i>Purificação NaOH</i> (ng/μl) IPC		<i>QIAamp</i> <i>Investigator</i> (ng/μl) IPC		<i>Prepfil</i> (ng/μl) IPC	
Paúl 7 dias	Ng	0,0040	30.04	0,0014	31.45	0,0009	30.46	--	--
	NI	0,0005	28.81	ind	30.79	ind	29.82	--	--
	Na	0,0024	30.14	0,0054	30.99	0,0007	30.14	--	--
	Pg	0,0050	30.39	0,0034	30.96	ind	30.49	--	--
	PI	0,0023	30.23	0,0041	30.43	ind	30.26	0,0030	37.42
	Pa	ind	29.91	ind	31.35	ind	30.49	0,0121	28.38
	Og	0,0050	28.86	0,0074	30.23	ind	30.10	--	--
	OI	0,0088	30.43	0,0025	30.23	ind	29.36	0,0062	30.81
	Oa	0,0069	29.86	0,0058	31.17	ind	30.10	--	--

b)

a)

		<i>DNAIQ</i> (ng/μl) IPC		<i>Chelex &</i> <i>Purificação NaOH</i> (ng/μl) IPC		<i>QIAamp</i> <i>Investigator</i> (ng/μl) IPC	
Paúl 15 dias	Ng	ind	27.64	0,0004	29.82	ind	36.67
	NI	0,0018	28.22	0,0011	28.80	ind	29.78
	Na	0,0076	28.47	0,0022	28.19	ind	29.10
	Pg	0,0031	28.61	0,0014	28.68	ind	37.93
	PI	ind	28.75	0,0027	28.95	ind	39.78
	Pa	0,0036	28.44	0,0032	28.59	ind	28.98
	Og	0,0069	27.85	0,0014	28.40	ind	32.38
	OI	ind	29.00	0,0133	28.39	ind	28.67
	Oa	0,0062	28.46	ind	28.56	ind	39.05

Tabela 11 - Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo pantanoso, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits *AmpFℓSTR® Identifier™*, *AmpFℓSTR® MiniFiler™* e *AmpFℓSTR® NGM SElect™*.

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifier	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	137	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	138	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a
	140	PI	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a
	141	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a
	142	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a
	143	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a
	575	Ol	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil

n.a. – não aplicável

Tabela 13 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo argiloso durante as épocas de verão e inverno.

As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 1 dia verão	Ng	0,1957	28.58	0,3560	29.73	5,0823	28.26
	Nl	0,0032	29.21	1,2641	29.46	0,0654	27.92
	Na	0,2569	29.44	0,0305	30.26	0,1782	30.31
	Pg	0,0413	28.82	0,0494	30.60	14,0705	32.44
	Pl	ind	30.17	ind	29.56	0,5012	28.51
	Pa	0,0053	28.43	0,0029	29.44	1,2254	30.57
	Og	0,0025	29.69	0,0050	28.67	7,0445	31.42
	OI	0,0042	29.46	0,0021	29.49	0,1227	30.37
	Oa	0,0251	29.72	0,0472	28.68	3,3142	31.82

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 1 dia inverno	Ng	0,8372	28.38	0,2650	28.48	0,4224	27.11
	Nl	0,0044	29.46	0,2755	28.31	0,4159	28.85
	Na	0,0928	29.31	2,4285	27.94	2,7502	26.97
	Pg	0,0322	29.14	0,3730	28.60	0,9049	27.31
	Pl	0,0067	29.75	3,2631	27.95	1,1426	27.28
	Pa	0,0987	29.55	5,9835	27.64	9,1756	26.47
	Og	0,3560	28.89	12,6197	27.91	1,8645	27.40
	OI	0,2082	29.48	6,6198	27.24	14,0705	26.15
	Oa	0,1562	29.49	4,4879	27.36	2,6045	26.89

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 3 dias verão	Ng	0,1276	30.16	0,0669	30.27	4,2814	27.89
	Nl	ind	30.06	0,0259	29.66	0,1383	30.05
	Na	0,0338	29.96	0,0127	29.97	0,6537	29.86
	Pg	0,0407	28.54	ind	29.96	0,0515	30.40
	Pl	ind	30.29	ind	29.45	0,0752	28.50
	Pa	0,0021	30.27	ind	30.13	0,0048	30.17
	Og	0,1218	30.27	0,0100	30.34	9,3483	30.06
	OI	0,0023	29.97	0,0233	29.49	0,6824	29.90
	Oa	0,0229	30.54	0,0042	30.84	28,3235	26.59

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 3 dias inverno	Ng	ind	28.68	1,2939	28.05	0,5676	27.21
	Nl	0,0027	28.42	2,7716	27.51	5,8003	26.35
	Na	0,0008	28.51	3,7825	27.19	14,8574	25.52
	Pg	0,0490	29.75	2,8151	27.18	0,4257	27.23
	Pl	0,0198	28.38	4,7389	27.25	3,4996	26.26
	Pa	0,0039	28.00	3,9631	27.47	21,7452	25.67
	Og	0,0247	28.81	4,8886	27.37	1,1337	27.27
	OI	ind	28.96	5,2837	27.32	16,5655	26.87
	Oa	0,0085	28.98	7,0995	27.24	16,3100	27.13

Tabela 13 – Continuação

		DNAIQ		Chelex & Purificação		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	NaOH	(ng/μl)	IPC
Argila 7 dias verão	Ng	0,0015	30.06	0,0088	29.10	0,0152	30.32
	NI	0,0476	30.45	0,0077	29.09	0,0312	28.72
	Na	ind	29.87	0,0053	29.30	0,0070	30.27
	Pg	0,0819	30.70	ind	29.46	0,0058	29.14
	PI	0,0325	30.19	ind	29.06	0,0060	29.94
	Pa	ind	29.88	0,0035	28.96	0,0194	29.62
	Og	0,0047	29.96	0,0032	29.72	0,0371	29.12
	OI	0,0073	29.96	0,0166	29.17	0,0746	28.50
	Oa	0,0995	30.06	0,0075	29.07	11,0575	29.23
		DNAIQ		Chelex & Purificação		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	NaOH	(ng/μl)	IPC
Argila 15 dias inverno	Ng	ind	29.08	ind	29.20	0,0019	29.35
	NI	ind	28.86	ind	30.15	ind	29.12
	Na	ind	29.01	ind	29.59	0,0051	28.70
	Pg	ind	35.09	ind	29.57	ind	29.20
	PI	ind	29.07	ind	29.77	0,0083	28.63
	Pa	ind	28.68	ind	29.60	ind	28.64
	Og	ind	28.52	ind	27.60	0,0014	28.88
	OI	ind	30.06	ind	29.37	0,0013	28.64
	Oa	0,0388	26.65	ind	29.23	3,0191	27.84
		DNAIQ		Chelex & Purificação		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	NaOH	(ng/μl)	IPC
Argila 7 dias inverno	Ng	ind	28.83	ind	28.84	ind	28.99
	NI	ind	28.66	0,0046	28.68	ind	29.48
	Na	ind	28.78	ind	28.92	ind	29.20
	Pg	ind	28.32	ind	28.54	ind	28.94
	PI	ind	28.48	0,0011	29.49	ind	28.78
	Pa	ind	28.52	ind	28.72	ind	28.79
	Og	ind	28.68	ind	28.77	ind	28.46
	OI	ind	28.90	ind	28.72	ind	28.66
	Oa	ind	28.78	ind	28.40	ind	29.03
		DNAIQ		Chelex & Purificação		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	NaOH	(ng/μl)	IPC
Argila 7 dias inverno	Ng	ind	28.37	0,0079	28.76	0,0111	28.70
	NI	ind	28.54	0,0029	28.63	0,0048	29.37
	Na	ind	28.49	0,0031	28.62	0,0274	28.81
	Pg	ind	29.07	0,0423	28.44	0,0005	29.08
	PI	ind	28.64	ind	28.46	0,0177	29.05
	Pa	ind	28.74	0,0037	28.70	0,0027	29.11
	Og	ind	29.02	0,0094	28.56	0,0003	29.02
	OI	ind	29.02	1,8074	28.09	0,0094	28.97
	Oa	0,0015	28.91	0,3001	28.83	0,0359	29.02

Tabela 13 – Continuação

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 30 dias verão	Ng	ind	28.84	ind	28.10	ind	28.19
	NI	ind	28.37	ind	28.33	ind	28.06
	Na	ind	28.54	ind	28.16	0,0009	28.38
	Pg	ind	29.15	0,0013	28.32	0,0033	28.42
	PI	ind	28.80	ind	28.46	ind	29.20
	Pa	ind	28.57	ind	28.61	0,0018	28.71
	Og	ind	28.03	ind	28.24	ind	28.52
	Ol	ind	28.57	ind	28.29	ind	28.42
	Oa	ind	28.04	ind	28.10	0,0044	28.79

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 3 meses verão	Ng	0,0025	27.67	0,0034	26.90	ind	27.26
	NI	ind	27.59	ind	26.92	ind	27.44
	Na	ind	27.82	ind	28.74	ind	27.59
	Pg	ind	28.06	0,0030	26.59	ind	28.02
	PI	ind	27.97	ind	26.95	0,0052	27.78
	Pa	0,0011	27.76	ind	27.03	ind	27.81
	Og	ind	27.69	ind	26.90	ind	27.56
	Ol	ind	27.65	ind	28.1	ind	27.42
	Oa	ind	27.46	0,0191	26.70	0,0031	27.23

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Argila 6 meses verão	Ng	ind	27.57	0,0062	28.93	ind	28.22
	NI	ind	27.50	ind	28.59	ind	27.33
	Na	ind	27.52	ind	28.88	0,0025	27.42
	Pg	ind	27.63	0,0020	28.78	0,0012	28.12
	PI	0,0015	27.71	ind	29.35	ind	27.73
	Pa	ind	27.83	ind	28.99	ind	28.25
	Og	ind	27.56	ind	33.67	0,0011	27.92
	Ol	ind	27.57	ind	32.06	0,0021	28.84
	Oa	ind	27.51	0,0094	32.68	ind	28.78

Tabela 15 - Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo argiloso durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits AmpFℓSTR® *Identifiler™*, AmpFℓSTR® *MiniFiler™* e AmpFℓSTR® *NGM Select™*.

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	46	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	47	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	48	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	49	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	54	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	Completo
	64	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Parcial	sem perfil	sem material extraído
	66	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	67	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	72	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	100	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	102	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	103	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	106	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	108	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	118	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	119	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	120	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	124	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem material extraído
	125	OI	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	197	OI	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	226	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	227	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	228	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	229	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	230	PI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	231	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	232	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	233	OI	1 dia	<i>QIAamp</i>	sem perfil	sem perfil	sem perfil
	234	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	334	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	335	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	336	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	337	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	338	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	340	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	341	OI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	342	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	353	NI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.

Tabela 15 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	355	Pg	7 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	356	Pl	7 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	360	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	532	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	533	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	537	Pa	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	538	Og	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	539	Ol	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	540	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	603	Oa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo + picos inespecíficos	sem material extraído
	630	Oa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	801	Oa	3 meses	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
inverno	910	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	911	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
	912	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	913	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	914	Pl	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	915	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	916	Og	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	917	Ol	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	918	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	928	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	929	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	930	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	931	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	932	Pl	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	933	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	934	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	935	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	936	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	983	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	984	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	985	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	986	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	987	Pl	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	988	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	989	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	990	Ol	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	991	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 15 – Continuação

Época	Amostra	Tip o	Tempo	Extraçã o	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
inverno	1037	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1038	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1039	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1040	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1041	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1042	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1043	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1044	Ol	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1045	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1058	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	Parcial
	1062	Ol	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1063	Oa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1073	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo + picos inespecíficos	sem perfil
	1075	Na	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1077	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	1081	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1127	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1129	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1130	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1132	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1133	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1134	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1135	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1148	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1149	PI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1151	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.

n.a. – não aplicável

Tabela 21 – Resultados de quantificação das amostras enterradas em solo arenoso durante as épocas de verão e inverno.

As siglas N, P e Q, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Areal 1 dia inverno	Ng	0,6231	28.68	0,1987	28.68	0,2433	27.25
	Nl	1,8791	28.18	2,3360	27.94	8,4893	26.48
	Na	3,2886	28.09	0,3908	28.81	12,5219	26.20
	Pg	1,7521	28.70	0,2358	29.35	1,7251	27.34
	Pl	24,0575	26.65	3,9324	27.98	46,9443	25.37
	Pa	3,1387	28.19	0,4257	28.90	18,4701	26.10
	Og	3,3401	28.03	0,2003	28.84	2,1114	27.39
	OI	16,6948	26.71	1,3876	28.05	22,7835	25.65
	Oa	0,9120	28.31	0,3878	28.28	1,8357	27.02

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Areal 3 dias inverno	Ng	0,0115	29.97	0,0229	31.07	0,0357	27.61
	Nl	0,7111	28.39	0,8637	28.03	1,0408	28.48
	Na	0,2509	28.93	0,0530	28.42	0,1675	27.46
	Pg	0,1782	28.65	0,1390	28.44	0,3294	28.66
	Pl	16,9564	26.74	5,2837	27.43	55,2686	24.92
	Pa	0,0498	29.20	0,2977	28.48	0,4324	27.49
	Og	0,4063	28.53	0,1434	28.55	0,1688	27.57
	OI	3,4456	28.15	1,5233	28.13	18,0443	25.80
	Oa	0,1075	28.76	0,0327	28.84	0,5460	27.65

		DNAIQ		Chelex & Purificação NaOH		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Areal 3 dias verão	Ng	1,4426	27.06	0,2003	33.28	1,3678	30.57
	Nl	0,0430	29.85	0,0255	29.46	1,8947	29.59
	Na	3,2631	30.82	0,0826	31.61	0,9136	30.01
	Pg	ind	29.11	ind	30.40	0,0388	29.38
	Pl	2,9495	30.48	1,9535	29.97	2,8850	29.92
	Pa	2,4666	27.25	3,7532	30.96	3,5145	29.61
	Og	ind	29.59	ind	29.52	0,0023	29.48
	OI	0,0244	26.90	0,0104	29.87	ind	29.36
	Oa	7,8544	26.91	0,7509	30.61	0,8242	29.33

Tabela 21 – Continuação

	<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Areal 7 dias verão	Ng	5,5792	31.34	0,5947	2,5643	29.16
	Nl	0,3095	28.48	0,5632	0,0168	28.89
	Na	2,3911	30.78	0,0569	0,0551	29.33
	Pg	0,0007	29.32	0,0140	ind	30.22
	Pl	5,5360	29.57	0,6894	1,7385	29.25
	Pa	0,0374	29.84	0,0166	0,1153	29.65
	Og	0,0024	30.16	0,0037	ind	29.21
	OI	0,0022	28.24	0,0071	0,0053	29.31
	Oa	0,2019	28.04	0,0913	1,4315	29.61

	<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Areal 15 dias verão	Ng	0,7056	26.95	0,0055	1,1971	28.25
	Nl	0,0217	28.88	ind	0,2529	28.91
	Na	2,4285	26.73	0,0371	0,0573	28.33
	Pg	ind	28.93	0,0022	ind	29.15
	Pl	2,6045	26.90	0,1728	2,2644	28.08
	Pa	0,0022	28.93	0,0186	0,0128	28.31
	Og	ind	29.10	ind	ind	28.44
	OI	ind	28.62	ind	0,0006	28.88
	Oa	0,0152	30.10	0,0238	0,0457	28.03

	<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Areal 7 dias inverno	Ng	ind	28.87	ind	0,0054	28.85
	Nl	ind	28.32	ind	ind	28.72
	Na	ind	28.60	0,0021	ind	28.80
	Pg	ind	28.76	ind	ind	29.06
	Pl	0,0054	28.77	0,0104	0,0935	29.05
	Pa	ind	29.23	0,0024	ind	28.93
	Og	0,0014	28.89	0,0054	ind	28.90
	OI	0,0015	29.00	0,0027	ind	28.61
	Oa	ind	28.63	ind	ind	28.68

	<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH		<i>QIAamp Investigator</i>	
	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Areal 15 dias inverno	Ng	ind	28.77	0,0082	0,0015	29.05
	Nl	ind	28.54	0,0046	0,0003	33.24
	Na	ind	28.52	0,0011	ind	28.56
	Pg	ind	28.41	ind	ind	29.77
	Pl	ind	29.01	0,0034	0,0047	28.51
	Pa	ind	28.60	ind	ind	28.41
	Og	ind	28.58	0,0054	0,0008	28.90
	OI	ind	28.66	0,0034	0,0015	28.84
	Oa	0,0011	29.19	ind	ind	28.84

Tabela 21 – Continuação

	<i>DNAIQ</i> (ng/ μ l)		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH (ng/ μ l)		<i>DNAIQ</i> (ng/ μ l)		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH (ng/ μ l)		<i>QIAamp Investigator</i> (ng/ μ l)	
	IPC		IPC		IPC		IPC		IPC	
Areal 30 dias inverno	Ng	ind	28.83	28.29	ind	28.33	ind	28.33	ind	28.46
	Nl	0,0022	28.91	28.14	ind	28.48	0,0019	28.48	0,0017	28.80
	Na	ind	28.85	28.27	ind	28.55	ind	28.35	ind	29.14
	Pg	0,0026	29.05	28.40	ind	28.47	ind	28.47	ind	29.05
	Pl	ind	28.90	28.50	ind	28.37	ind	28.53	0,0057	28.65
	Pa	0,0008	28.99	27.46	0,0080	28.61	0,0183	28.68	0,0040	28.72
	Og	ind	28.96	28.17	ind	28.66	ind	28.87	ind	28.59
	OI	ind	28.27	28.12	ind	28.03	ind	28.76	0,0054	28.49
	Oa	ind	29.37	28.04	ind	28.73	0,0024	28.75	ind	29,05

	<i>DNAIQ</i> (ng/ μ l)		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH (ng/ μ l)		<i>QIAamp Investigator</i> (ng/ μ l)	
	IPC		IPC		IPC	
Areal 3 meses verão	Ng	ind	27.54	27.07	ind	27.56
	Nl	0,0007	28.01	26.53	ind	27.43
	Na	ind	27.65	26.95	ind	28.18
	Pg	ind	27.38	27.21	0,0010	27.64
	Pl	ind	27.94	26.62	ind	27.49
	Pa	ind	27.86	27.51	ind	27.94
	Og	ind	27.71	26.94	ind	27.58
	OI	ind	27.66	26.93	ind	27.28
	Oa	ind	27.34	26.70	ind	27.24

Tabela 21 – Continuação

	<i>DNAIQ</i> (ng/ μ l)		<i>Chelex & Purificação</i> NaOH (ng/ μ l)		<i>QIAamp Investigator</i> (ng/ μ l)	
	ind	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Areal 6 meses verão	Ng	27.74	ind	28.51	ind	27.44
	Nl	27.55	0,0024	28.34	0,0020	27.36
	Na	27.72	ind	28.56	ind	27.86
	Pg	27.81	ind	28.46	ind	27.76
	Pl	27.92	ind	28.49	ind	27.59
	Pa	27.74	0,0069	28.77	ind	27.91
	Og	27.80	ind	28.76	ind	28.13
	Ol	27.67	0,0060	28.61	ind	27.92
	Oa	27.47	ind	29.89	ind	27.69

Tabela 23 - Perfis genéticos obtidos das amostras enterradas em solo arenoso durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits AmpF ℓ STR® *Identifiler*™, AmpF ℓ STR® *MiniFiler*™ e AmpF ℓ STR® *NGM Select*™.

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	55	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	56	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	57	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	58	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	59	PI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	60	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	62	Ol	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	63	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	73	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	74	NI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	75	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	76	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	77	PI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	78	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	79	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	80	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	81	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	109	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	110	NI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	111	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	113	PI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	114	Pa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	116	Ol	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	117	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	127	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	128	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	contaminada	contaminada
	129	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	131	PI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	132	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	134	Ol	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	135	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	199	Ng	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	200	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Parcial	contaminada
	201	Na	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	202	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	203	PI	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	204	Pa	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil

Tabela 23 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	207	Oa	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	235	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	236	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	237	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	238	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	239	PI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	240	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	241	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	242	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	243	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	343	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	344	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	345	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	346	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	347	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	348	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	351	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	361	Ng	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	362	NI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	363	Na	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	365	PI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	366	Pa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	369	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	525	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	527	PI	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	528	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	531	Oa	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	541	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	542	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	543	Na	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a. / Completo	Completo	n.a.
	545	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	546	Pa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	549	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	586	Ng	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	587	NI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	588	Na	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	590	PI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	594	Oa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	631	Ng	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 23 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	632	NI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	633	Na	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	635	PI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	636	Pa	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	639	Oa	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	645	Pa	30 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	789	Pa	3 meses	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
inverno	901	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Parcial	sem material	sem material
	902	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	903	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	904	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Parcial	sem perfil	Completo
	905	PI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	906	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	907	Og	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	908	Ol	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	909	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	919	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	920	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	921	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	922	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	923	PI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	924	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	925	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	926	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	927	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	974	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	975	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	976	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	977	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	sem perfil	sem perfil
	978	PI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	979	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	980	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	981	Ol	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	982	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	1028	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
	1029	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1030	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1031	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	1032	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 23 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
inverno	1033	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Parcial	sem perfil	sem perfil
	1034	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1035	Ol	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1036	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1050	Pl	7 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
	1068	Pl	7 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1118	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1119	Nl	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1120	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1121	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1122	Pl	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1123	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1124	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1125	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1126	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1136	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1137	Nl	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1138	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1139	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1140	Pl	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1141	Pa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1142	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1143	Ol	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1144	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1359	Ol	30 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil

n.a. – não aplicável

Tabela 28 – Resultados de quantificação das amostras colocadas à superfície de um solo de um bosque durante as épocas de verão e inverno
As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente;
ind – indeterminado.

		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 1 dia verão	Ng	2,1279	27.01	0,2589	31.,17	2,0152	28.83
	Nl	2,1279	26.96	0,6183	33.21	7,3809	31.16
	Na	1,9085	30.10	0,1715	38.81	1,2349	30.38
	Pg	1,0737	29.96	0,4324	34.60	5,5360	31.31
	Pl	1,6984	27.09	0,8438	35.39	7,0445	30.98
	Pa	1,0905	30.01	0,4425	30.05	0,6528	30.30
	Og	2,1781	29.63	0,4674	38.91	4,8886	30.67
	Ol	2,2821	27.04	1,3985	34.49	6,5177	30.73
	Oa	1,0990	30.30	0,1059	37.10	4,0566	30.08
		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 3 dias verão	Ng	0,7279	30.15	0,2650	34.09	1,5837	29.95
	Nl	4,1847	29.88	0,7167	32.32	8,1657	30.31
	Na	2,3911	29.70	0,3588	29.96	1,2254	29.76
	Pg	0,8307	29.85	0,6378	34.84	2,5844	30.37
	Pl	1,3244	27.03	0,5251	36.31	8,9641	30.26
	Pa	1,4315	29.67	0,2805	31.19	1,1162	29.71
	Og	1,5115	29.55	0,4495	31.76	1,0820	29.52
	Ol	1,5593	30.33	0,5720	33.79	4,7022	29.73
	Oa	3,4725	29.48	0,8438	38.32	1,7385	30.27
		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 1 dia inverno	Ng	8,5556	26.73	1,1076	27.64	1,6464	27.27
	Nl	0,9120	28.58	0,4784	30.95	7,5550	27.25
	Na	3,9019	27.67	1,2349	28.25	1,0820	27.25
	Pg	7,6140	27.34	1,6853	27.54	2,7716	27.11
	Pl	0,7568	28.63	0,6135	27.85	1,9996	27.41
	Pa	0,9934	28.64	2,3360	27.43	4,2173	27.03
	Og	13,9616	26.84	2,2295	28.26	2,5052	27.07
	Ol	0,2820	28.81	0,6378	29.63	2,1114	27.07
	Oa	0,2268	28.59	0,5051	28.89	5,0823	26.58
		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 3 dias inverno	Ng	2,1613	27.69	0,6183	27.20	1,5593	28.05
	Nl	6,3674	26.89	1,4539	26.57	15,2079	26.13
	Na	1,7658	27.64	0,5170	27.16	1,4998	27.15
	Pg	18,6142	26.45	2,6868	26.92	2,2644	27.19
	Pl	21,4098	26.44	1,2939	27.22	21,4098	26.00
	Pa	36,6060	26.07	4,8131	26.82	30,8519	25.57
	Og	2,0951	28.17	2,5445	27.12	1,8357	27.26
	Ol	5,2022	27.53	0,2670	27.44	28,1041	25.50
	Oa	0,2977	29.28	0,2471	27.61	0,6183	28.09

Tabela 28 – Continuação

	DNAIQ		Chelex		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 7 dias inverno	Ng	1,3662	29,75	0,2886	29,01	1,3244	29,03	29,03	0,1237	29,09
	Nl	0,1423	29,85	0,1882	28,90	4,2502	28,40	28,40	40,1850	26,41
	Na	0,1059	27,96	0,1092	29,08	0,1084	29,31	29,31	13,6398	27,17
	Pg	0,7568	31,51	0,4063	29,03	0,3346	29,38	29,38	1,3876	28,76
	Pl	0,1987	31,04	0,1358	29,01	1,5472	28,20	28,20	128,9606	25,18
	Pa	0,1782	30,46	0,2712	29,83	0,7867	28,40	28,40	6,0302	27,61
	Og	4,5938	29,41	0,2954	28,66	1,3142	28,79	28,79	0,1927	28,94
	OI	0,1868	29,95	0,5901	28,03	0,7929	28,49	28,49	48,4269	25,76
	Oa	0,4784	28,99	0,3451	29,16	0,1316	28,81	28,81	1,7117	28,06
	DNAIQ		Chelex		DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 15 dias inverno	Ng	0,0644	29,86	0,0454	29,00	0,3848	28,72	28,72	0,5810	28,41
	Nl	0,0261	29,92	0,1825	27,59	0,0116	28,71	28,71	7,3237	27,40
	Na	0,0091	27,91	0,0819	28,65	0,0340	28,81	28,81	0,8637	28,55
	Pg	0,3071	30,38	0,1127	29,89	0,2414	28,54	28,54	0,3701	28,79
	Pl	0,0305	28,08	0,0423	29,79	0,0310	28,41	28,41	8,9641	27,29
	Pa	0,1358	29,65	0,2931	28,57	0,3818	28,51	28,51	0,0472	29,30
	Og	0,1825	27,16	0,4426	28,33	0,2268	28,19	28,19	0,4973	28,95
	OI	0,0596	29,53	0,4935	28,72	0,0379	28,29	28,29	6,0302	27,00
	Oa	0,0177	29,95	0,3095	29,67	0,1825	28,59	28,59	0,6682	28,48

Tabela 28 – Continuação

	DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 30 dias inverno	Ng	ind	0,0014	28.90	ind	27.28
	Nl	0,0012	0,0010	27.60	0,0048	27.47
	Na	ind	0,0037	27.56	0,0514	27.49
	Pg	0,0021	0,0052	28.82	ind	27.56
	Pl	ind	ind	28.33	0,0282	27.54
	Pa	0,0014	0,1059	28.84	0,0723	27.28
	Og	0,0582	0,2268	28.65	0,0097	27.25
	OI	0,0021	0,3346	30.47	0,0259	27.09
	Oa	0,0141	0,0068	33.47	0,0776	27.23

	DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 3 meses inverno	Ng	ind	0,0040	28.38	0,0032	27.47
	Nl	ind	ind	28.33	ind	27.47
	Na	0,0016	0,0060	37.17	0,0024	27.38
	Pg	ind	ind	28.76	ind	27.71
	Pl	ind	ind	29.24	ind	27.82
	Pa	0,0155	0,0058	28.61	0,0296	27.55
	Og	ind	0,0013	28.47	0,0057	27.47
	OI	ind	ind	29.35	ind	27.24
	Oa	0,0019	0,0385	31.57	ind	27.25

	DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 30 dias inverno	Ng	ind	ind	28.21	0,0056	28.55
	Nl	0,0202	0,0039	28.09	0,0070	28.51
	Na	ind	ind	28.11	ind	28.66
	Pg	ind	ind	28.21	ind	28.87
	Pl	0,0114	0,0047	28.17	2,6868	27.85
	Pa	ind	ind	28.43	ind	29.13
	Og	ind	ind	28.62	0,0004	29.21
	OI	0,0204	0,0010	28.29	0,0776	28.61
	Oa	ind	ind	28.00	ind	28.80

	DNAIQ		Chelex		QIAamp Investigator	
	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Superfície 3 meses inverno	Ng	ind	0,0017	28.19	ind	28.66
	Nl	ind	ind	27.93	0,0044	28.42
	Na	0,0018	0,0018	27.91	ind	28.44
	Pg	0,0015	ind	28.23	ind	28.63
	Pl	ind	0,0003	28.08	0,0022	28.62
	Pa	ind	ind	28.22	ind	28.59
	Og	0,0009	ind	28.34	ind	28.74
	OI	ind	ind	28.61	0,0072	28.54
	Oa	ind	ind	28.62	ind	28.24

Tabela 28 – Continuação

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC	(ng/ μ l)	IPC
Superfície 6 meses verão	Ng	ind	27.49	ind	27.77	ind	27.70
	Nl	0,0015	27.39	ind	39.01	ind	27.52
	Na	ind	27.48	ind	28.79	0,0018	27.68
	Pg	ind	27.77	ind	28.61	ind	27.76
	Pl	ind	27.81	ind	28.23	ind	27.76
	Pa	ind	27.35	0,0027	30.11	ind	27.83
	Og	ind	27.51	0,0048	27.71	ind	27.61
	Ol	ind	27.46	0,0011	28.22	ind	27.42
	Oa	ind	27.22	ind	29.15	0,0027	27.39

Tabela 30 - Perfis genéticos obtidos das amostras colocadas à superfície do solo de um bosque durante as épocas de inverno e verão, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits AmpFℓSTR® *Identifiler™*, AmpFℓSTR® *MiniFiler™* e AmpFℓSTR® *NGM SElect™*.

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	82	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	83	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	84	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	85	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	86	PI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	87	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	88	Og	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	89	OI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	90	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	91	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	92	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	93	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	94	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	95	PI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	96	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	97	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	98	OI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	99	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	262	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	263	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	264	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	265	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	266	PI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	267	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	268	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	269	OI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	270	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	271	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	272	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	273	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	274	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	275	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	276	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	277	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	278	OI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	279	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	280	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 30 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifier	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	281	NI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	282	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	283	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	284	PI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	285	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	286	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	287	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	288	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	289	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	290	NI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	291	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	292	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	293	PI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	294	Pa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	295	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	296	Ol	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	297	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	406	Ng	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	407	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
	408	Na	7 dias	<i>Chelex</i>	sem perfil	contaminada	contaminada
	409	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	410	PI	7 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	411	Pa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	412	Og	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	413	Ol	7 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
	414	Oa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	415	Ng	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	416	NI	15 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	417	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	418	Pg	15 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	419	PI	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	420	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
	421	Og	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	422	Ol	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	423	Oa	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	478	Ng	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	479	NI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	480	Na	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	481	Pg	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 30 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	482	PI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	483	Pa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	484	Og	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	485	Ol	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	486	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	487	Ng	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	488	NI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	490	Pg	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	491	PI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	492	Pa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	493	Og	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	494	Ol	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	495	Oa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	604	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	605	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	606	Na	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	607	Pg	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	608	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	609	Pa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	610	Og	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	611	Ol	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	612	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Parcial	sem perfil	sem perfil
	613	Ng	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	614	NI	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	sem perfil	sem material extraído
	615	Na	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	616	Pg	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	617	PI	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	618	Pa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	619	Og	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	620	Ol	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	621	Oa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	699	Pa	30 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
	700	Og	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	Completo	n.a.
	701	Ol	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	711	Oa	3 meses	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	718	Og	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	720	Oa	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	726	Pa	3 meses	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	732	Na	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.

Tabela 30 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
verão	734	Pl	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	735	Pa	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	737	Ol	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	738	Oa	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	744	Pa	3 meses	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
inverno	938	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	939	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	940	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	941	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	942	Pl	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	943	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	944	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	945	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	946	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	947	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	948	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	949	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	950	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	951	Pl	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	952	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	953	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	954	Ol	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	955	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	956	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	957	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	958	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	959	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	960	Pl	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	961	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	962	Og	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	963	Ol	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	964	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	965	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	966	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	967	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	968	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	969	Pl	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	970	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	971	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 30 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
inverno	972	Ol	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	973	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	contaminada	contaminada
	992	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	993	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	994	Na	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	995	Pg	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	996	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	997	Pa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	998	Og	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	999	Ol	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1000	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1001	Ng	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1002	NI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1003	Na	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1004	Pg	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1005	PI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1006	Pa	15 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1007	Og	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1008	Ol	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1009	Oa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1010	Ng	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1011	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1012	Na	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1013	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1014	PI	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1015	Pa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1016	Og	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1017	Ol	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1018	Oa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1019	Ng	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1020	NI	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1021	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1022	Pg	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1023	PI	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1024	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1025	Og	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1026	Ol	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1027	Oa	15 dias	<i>Chelex</i>	sem perfil	contaminada	contaminada
	1082	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 30 – Continuação

Época	Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
inverno	1083	NI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1084	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1085	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1086	PI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1087	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1088	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1089	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1090	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1091	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1092	NI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1093	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1094	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1095	PI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1096	Pa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1097	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1098	Ol	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1099	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1100	Ng	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1101	NI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1102	Na	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1103	Pg	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1104	PI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1105	Pa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1106	Og	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1107	Ol	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1108	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1109	Ng	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1110	NI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1111	Na	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1112	Pg	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1113	PI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1115	Og	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1116	Ol	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1117	Oa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1248	PI	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
	1251	Ol	30 dias	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1299	NI	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1302	PI	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
	1305	Ol	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.

n.a. – não aplicável

Tabela 33 – Resultados de quantificação das amostras colocadas num poço.

As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente, ind – indeterminado.

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Poço 1 dia	Ng	ind	32.61	0,0034	30.60	ind	29.44
	NI	0,0010	31.43	ind	29.79	ind	29.83
	Na	ind	31.76	ind	30.06	ind	30.17
	Pg	0,0011	31.30	ind	30.00	ind	29.49
	PI	ind	31.72	ind	29.84	ind	30.57
	Pa	ind	31.60	ind	30.04	ind	29.58
	Og	0,0017	31.14	0,0021	29.55	ind	28.98
	OI	0,0004	30.64	0,0019	29.82	ind	30.35
	Oa	ind	30.63	ind	30.23	ind	29.92

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Poço 3 dias	Ng	ind	29.94	0,0050	29.55	ind	29.82
	NI	ind	29.74	0,0023	29.66	0,0042	29.48
	Na	ind	30.16	ind	29.88	0,0041	29.52
	Pg	0,0028	30.37	0,0024	29.58	ind	29.52
	PI	0,0054	30.43	ind	27.64	ind	29.57
	Pa	0,0055	30.16	ind	29.75	ind	29.30
	Og	0,0080	29.94	0,0025	29.16	ind	29.10
	OI	ind	30.84	0,0021	30.06	ind	29.39
	Oa	0,0080	29.94	0,0062	29.95	ind	29.51

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Poço 7 dias	Ng	ind	30.64	ind	29.91	ind	29.44
	NI	ind	29.69	ind	29.69	ind	29.83
	Na	ind	29.69	ind	30.01	ind	30.17
	Pg	0,0011	30.51	ind	30.69	ind	29.49
	PI	ind	30.28	ind	30.66	ind	30.57
	Pa	ind	30.36	ind	30.19	ind	29.58
	Og	ind	30.25	ind	29.81	ind	28.98
	OI	ind	29.35	ind	29.90	ind	30.35
	Oa	ind	36.38	ind	29.42	ind	29.92

Tabela 34 – Resultados de quantificação das amostras colocadas dentro de uma habitação.

As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 1 dia	Ng	0,4063	30.28	0,1562	30.06	1,6464	28.69
	NI	0,3908	30.17	0,1423	28.90	1,3452	28.65
	Na	0,3759	30.37	0,1445	29.66	0,7279	27.30
	Pg	0,4032	30.49	0,4324	29.20	1,9384	28.39
	PI	0,7336	30.04	0,4224	29.33	2,0468	28.49
	Pa	1,0408	29.52	0,5012	29.71	1,5714	28.64
	Og	1,0905	29.92	0,4291	29.12	3,0426	28.09
	OI	0,8179	30.05	1,6853	27.27	2,7502	28,00
	Oa	1,2349	29.72	0,1368	30.19	1,5714	28.16

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 3 dias	Ng	0,7056	29.86	0,1987	29.71	1,0011	28.33
	NI	0,6631	30.04	0,7629	29.42	4,0252	27.56
	Na	0,3908	29.99	0,1820	31.80	0,4973	28.48
	Pg	0,8179	29.76	0,3848	29.23	1,2254	28.37
	PI	0,4358	29.81	0,2798	28.83	3,5821	27.99
	Pa	0,4566	29.89	0,0776	32.21	0,6378	28.62
	Og	0,6894	29.28	0,2295	30.36	1,1786	28.54
	OI	0,8772	29.72	1,3442	30.14	2,6868	28.04
	Oa	0,5012	29.99	0,3940	30.92	0,6947	28.59

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 7 dias	Ng	0,1067	30.15	0,1987	29.71	1,0990	28.83
	NI	0,7393	30.54	0,5720	30.05	4,4532	28.04
	Na	0,1675	29.80	0,2199	29.49	0,3024	29.37
	Pg	0,1782	29.96	0,2490	29.10	1,7521	28.41
	PI	0,2954	30.17	0,9705	28.65	5,0039	26.60
	Pa	0,2099	29.87	0,3346	28.79	0,2034	27.77
	Og	0,2509	29.65	0,1624	30.10	2,7502	27.66
	OI	0,2340	29.52	0,2549	29.12	4,0882	27.51
	Oa	0,2629	29.96	0,2414	31.93	0,5130	28.88

Tabela 34 – Continuação

Habitação 15 dias		DNAIQ (ng/μl) IPC		Chelex (ng/μl) IPC		QIAamp Investigator (ng/μl) IPC	
		Ng	0,2165 29.69	0,2629 28.54	1,1786 28.48		
		NI	0,0179 29.25	0,3320 30.18	0,1882 27.77		
		Na	0,2268 29.52	0,1227 29.75	0,3878 28.15		
		Pg	0,1599 29.81	0,1897 31.55	1,2839 28.49		
		PI	0,4001 29.73	0,5855 30.21	1,0571 28.75		
		Pa	0,1181 29.76	0,1445 32.08	0,6378 28.86		
		Og	0,2019 29.07	0,1514 30.36	1,4539 28.44		
		OI	0,4257 29.61	1,0737 27.53	2,2469 27.96		
		Oa	0,2131 29.24	0,1782 30.14	0,5417 28.49		

Habitação 30 dias		DNAIQ (ng/μl) IPC		Chelex (ng/μl) IPC		QIAamp Investigator (ng/μl) IPC	
		Ng	0,1127 29.43	0,1390 30.64	0,5334 28.54		
		NI	0,1227 29.59	0,1208 32.04	1,3557 28.22		
		Na	0,1109 29.12	0,2376 29.26	0,1649 28.75		
		Pg	0,2148 29.62	0,3095 31.97	0,8909 28.52		
		PI	0,0475 29.14	0,1237 29.77	0,7111 28.59		
		Pa	0,1853 29.13	0,2954 29.30	0,1839 28.99		
		Og	0,3560 28.79	0,4566 32.06	1,4882 28.20		
		OI	0,4674 28.56	0,2395 31.70	0,5588 28.74		
		Oa	0,2909 29.24	0,1316 29.35	0,3759 28.57		

Habitação 3 meses		DNAIQ (ng/μl) IPC		Chelex (ng/μl) IPC		QIAamp Investigator (ng/μl) IPC	
		Ng	0,2569 28.68	0,1611 29.80	0,6040 28.35		
		NI	0,0251 28.47	0,1237 30.72	2,2122 27.65		
		Na	0,2034 29.21	0,4159 30.21	0,2509 28.73		
		Pg	0,3193 29.23	0,2490 29.99	0,7393 28.47		
		PI	0,0498 29.04	0,2509 32.81	4,8131 27.43		
		Pa	0,1412 28.00	0,5460 29.86	0,6894 28.16		
		Og	0,6528 28.16	0,2670 29.82	0,7627 28.42		
		OI	0,2529 28.34	0,1059 30.45	4,9652 27.54		
		Oa	0,2358 28.74	0,6478 29.87	0,7929 28.66		

Tabela 34 – Continuação

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 6 meses	Ng	0,1574	28.82	0,1327	29.72	0,5502	28.62
	NI	0,0183	27.56	0,1755	29.72	2,5248	27.76
	Na	0,1286	29.33	0,3701	29.37	0,1825	28.66
	Pg	0,2629	29.66	0,2304	29.62	0,5460	28.43
	PI	0,0649	27.43	0,2182	30.29	1,4094	27.70
	Pa	0,2148	29.37	0,4392	29.34	0,2691	28.83
	Og	0,5855	28.67	0,3878	29.24	0,5588	28.35
	OI	0,1136	29.57	0,3600	30.42	4,8886	27.28
	Oa	0,2670	29.51	0,4601	29.78	0,2712	28.75

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 12 meses	Ng	0,4063	26.52	0,4530	26.40	0,4710	28.43
	NI	0,0921	26.54	0,2268	26.57	1,1971	28.18
	Na	0,2842	26.51	0,4935	26.55	0,1190	28.87
	Pg	0,5292	26.46	0,3848	26.67	0,4224	28.69
	PI	0,0928	26.70	0,1502	26.61	1,4426	28.11
	Pa	0,3970	26.59	0,5545	26.77	0,4973	28.71
	Og	1,0990	26.56	0,3616	26.94	0,7167	28.70
	OI	0,1491	26.94	0,1853	26.94	4,1201	27.73
	Oa	0,5051	26.71	0,7746	26.62	0,5460	28.86

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Habitação 24 meses	Ng	0,5211	28.18	0,1853	28.51	0,1957	28.17
	NI	0,1067	28.57	0,0957	28.18	1,5233	27.58
	Na	0,2909	28.38	0,2509	28.31	0,5375	28.39
	Pg	0,5947	28.36	0,4935	28.60	0,0858	28.65
	PI	0,1208	28.68	0,0610	28.49	2,2122	28.21
	Pa	0,2050	28.70	0,8772	28.30	0,5947	28.74
	Og	0,6087	27.91	0,4127	28.44	0,1306	28.58
	OI	0,0950	28.34	0,0596	27.93	3,4189	28.01
	Oa	0,3425	28.32	0,4601	28.10	0,3478	28.75

Tabela 36 - Perfis genéticos obtidos das amostras colocadas dentro de uma habitação, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits AmpFℓSTR® *Identifiler™*, AmpFℓSTR® *MiniFiler™* e AmpFℓSTR® *NGM SSelect™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
154	Ng	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
155	NI	1 dia	<i>Chelex</i>	Parcial	Contaminada	Contaminada
156	Na	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
157	Pg	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
158	PI	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
159	Pa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
160	Og	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
161	Ol	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
162	Oa	1 dia	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
163	Ng	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
164	NI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
165	Na	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
166	Pg	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
167	PI	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
168	Pa	3 dias	<i>Chelex</i>	n.a. / Completo	não realizado	n.a.
169	Og	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
170	Ol	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
171	Oa	3 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
172	Ng	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
173	NI	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
174	Na	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
175	Pg	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
176	PI	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
177	Pa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
178	Og	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
179	Ol	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
180	Oa	7 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
181	Ng	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
182	NI	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
183	Na	15 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Completo	n.a.
184	Pg	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
185	PI	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
186	Pa	15 dias	<i>Chelex</i>	Parcial	Contaminada	Contaminada
187	Og	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
188	Ol	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
189	Oa	15 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
208	Ng	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
209	NI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
210	Na	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
211	Pg	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
212	PI	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
213	Pa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
214	Og	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
215	Ol	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
216	Oa	1 dia	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
217	Ng	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
218	NI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
219	Na	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
220	Pg	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
221	PI	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
222	Pa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
223	Og	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
224	Ol	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
225	Oa	3 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
370	Ng	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
371	NI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
372	Na	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
373	Pg	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
374	PI	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
375	Pa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
376	Og	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
377	Ol	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
378	Oa	7 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
379	Ng	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
380	NI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	sem perfil	sem perfil
381	Na	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
382	Pg	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
383	PI	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
384	Pa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
385	Og	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
386	Ol	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
387	Oa	15 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
388	Ng	30 dias	<i>Chelex</i>	Contaminada	Contaminada	Contaminada
389	NI	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
390	Na	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
391	Pg	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
392	PI	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
393	Pa	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
394	Og	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
395	Ol	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
396	Oa	30 dias	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
397	Ng	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
398	NI	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
399	Na	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
400	Pg	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
401	PI	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
402	Pa	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
403	Og	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
404	Ol	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
405	Oa	3 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
496	Ng	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
497	NI	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
498	Na	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
499	Pg	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
500	PI	30 dias	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
501	Pa	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
502	Og	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
503	Ol	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
504	Oa	30 dias	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
505	Ng	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
506	NI	3 meses	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
507	Na	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
508	Pg	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
509	PI	3 meses	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
510	Pa	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
511	Og	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
512	Ol	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
513	Oa	3 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
550	Ng	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
551	NI	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
552	Na	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
553	Pg	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
554	PI	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
555	Pa	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
556	Og	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
557	Ol	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
558	Oa	6 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
559	Ng	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Parcial	Completo	n.a.
560	NI	6 meses	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
561	Na	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
562	Pg	6 meses	<i>DNAIQ</i>	sem perfil	sem perfil	sem perfil
563	Pl	6 meses	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
564	Pa	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
565	Og	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
566	Ol	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo + picos inespecíficos	Completo + picos inespecíficos	n.a.
567	Oa	6 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
856	Ng	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
857	NI	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
858	Na	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
859	Pg	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
860	Pl	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
861	Pa	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
862	Og	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
863	Ol	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
864	Oa	12 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
865	Ng	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
866	NI	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
867	Na	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
868	Pg	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
869	Pl	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
870	Pa	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
871	Og	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
872	Ol	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
873	Oa	12 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1262	Ng	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1263	NI	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	Completo	n.a.
1264	Na	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1265	Pg	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1266	Pl	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1267	Pa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1268	Og	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1269	Ol	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1270	Oa	1 dia	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1271	Ng	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1272	NI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1273	Na	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1274	Pg	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1275	PI	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1276	Pa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1277	Og	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1278	Ol	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1279	Oa	3 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1280	Ng	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1281	NI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1282	Na	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1283	Pg	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1284	PI	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1285	Pa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1286	Og	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1287	Ol	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1288	Oa	7 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1289	Ng	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1290	NI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1291	Na	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1292	Pg	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1293	PI	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1294	Pa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1295	Og	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1296	Ol	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1297	Oa	15 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1316	Ng	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1317	NI	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1318	Na	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1319	Pg	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1320	PI	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1321	Pa	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1322	Og	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1323	Ol	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1324	Oa	30 dias	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1325	Ng	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1326	NI	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1327	Na	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1328	Pg	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1329	PI	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1330	Pa	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1331	Og	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1332	Ol	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1333	Oa	3 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1334	Ng	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1335	NI	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1336	Na	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1337	Pg	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1338	PI	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1339	Pa	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1340	Og	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1341	Ol	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1342	Oa	6 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1343	Ng	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1344	NI	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1345	Na	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1346	Pg	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1347	PI	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1348	Pa	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1349	Og	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1350	Ol	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1351	Oa	12 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1487	Ng	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1488	NI	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1489	Na	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1490	Pg	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1491	PI	24 meses	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1492	Pa	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1493	Og	24 meses	<i>Chelex</i>	sem perfil	Contaminada	Contaminada
1494	Ol	24 meses	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1495	Oa	24 meses	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1496	Ng	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1497	NI	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1498	Na	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1499	Pg	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1500	PI	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1501	Pa	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1502	Og	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 36 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1503	Ol	24 meses	<i>DNAIQ</i>	sem perfil	sem perfil	sem perfil
1504	Oa	24 meses	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1505	Ng	24 meses	<i>QIAamp</i>	sem perfil	Contaminada	Contaminada
1506	NI	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1507	Na	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1508	Pg	24 meses	<i>QIAamp</i>	n.a. / Completo	não realizado	n.a.
1509	PI	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1510	Pa	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1511	Og	24 meses	<i>QIAamp</i>	sem perfil	sem material extraído	sem material extraído
1512	Ol	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1513	Oa	24 meses	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

n.a. – não aplicável

Tabela 39 – Resultados de quantificação das amostras lavadas com detergente

As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Após 1ª lavagem com detergente	Ng	5,8003	27.24	1,0737	28.39	10,3103	27.78
	NI	0,0097	28.54	0,4601	27.63	0,2251	29.27
	Na	0,1456	27.98	1,5714	28.28	11,4957	27.59
	Pg	12,3288	27.01	2,0309	28.34	9,2472	27.81
	Pl	0,3701	28.78	0,0852	28.41	0,4063	29.42
	Pa	6,0302	27.56	1,0905	28.62	1,8215	28.62
	Og	11,0575	27.02	1,9535	28.10	9,3921	27.48
	Ol	0,1701	29.20	0,0776	28.42	0,3701	28.89
	Oa	9,0340	27.09	2,3542	27.74	3,7825	28.27

		<i>DNAIQ</i>		<i>Chelex</i>		<i>QIAamp Investigator</i>	
		(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC	(ng/μl)	IPC
Após 2ª lavagem com detergente	Ng	14,2910	26.59	0,9630	28.29	4,9652	27.39
	NI	0,0123	28.39	0,0014	28,35	0,1266	29.11
	Na	11,4067	26.55	2,3726	28.10	11,7669	27.35
	Pg	13,1198	26.74	1,7117	28.44	7,2670	27.57
	Pl	2,1951	27.83	0,1101	28.48	1,4539	28.48
	Pa	6,0302	27.49	1,1605	28.68	1,6853	28.55
	Og	13,2222	26.80	2,0951	28.12	7,1549	27.60
	Ol	0,1084	27.42	0,0479	28.18	0,1358	28.96
	Oa	8,1657	27.17	1,8215	28.09	3,4725	27.77

Tabela 40 - Perfis genéticos obtidos das amostras lavadas com detergente, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits AmpFℓSTR® *Identifiler™*, AmpFℓSTR® *MiniFiler™* e AmpFℓSTR® *NGM Select™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1379	Ng	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1380	NI	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1381	Na	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1382	Pg	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1383	PI	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1384	Pa	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1385	Og	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1386	OI	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1387	Oa	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1388	Ng	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1390	Na	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1391	Pg	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1392	PI	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1393	Pa	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1394	Og	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1395	OI	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1396	Oa	2ª Lavagem	<i>Chelex</i>	Completo	n.a.	n.a.
1397	Ng	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1399	Na	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1400	Pg	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1401	PI	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1402	Pa	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1403	Og	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1404	OI	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1405	Oa	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1406	Ng	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1407	NI	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Parcial	sem perfil
1408	Na	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1409	Pg	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1410	PI	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1411	Pa	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1412	Og	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1413	OI	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	sem perfil	sem perfil	contaminada
1414	Oa	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	Completo	n.a.	n.a.
1415	Ng	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1416	NI	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1417	Na	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

Tabela 40 – Continuação

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1418	Pg	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1419	PI	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1420	Pa	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1421	Og	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1422	Ol	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1423	Oa	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1424	Ng	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1425	NI	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1426	Na	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1427	Pg	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1428	PI	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1429	Pa	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1430	Og	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1431	Ol	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.
1432	Oa	2ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	Completo	n.a.	n.a.

n.a. – não aplicável

Tabela 42 – Resultados de quantificação das amostras lavadas com lixívia.

As siglas N, P e O, são as iniciais dos dadores de sangue e as siglas g, l e a são as iniciais para ganga, licra e algodão, respetivamente; ind – indeterminado.

		<i>DNAIQ</i> (ng/μl) IPC		<i>Chelex</i> (ng/μl) IPC		<i>QIAamp Investigator</i> (ng/μl) IPC	
Após 1ª lavagem com lixívia	Ng	ind	28.90	ind	28.68	ind	28.67
	Nl	ind	28.68	ind	28.07	0,0072	28.57
	Na	ind	28.86	ind	28.98	ind	28.83
	Pg	0,0038	28.58	0,0190	28.84	ind	28.61
	Pl	ind	28.59	ind	28.18	ind	28.49
	Pa	ind	28.72	ind	28.59	ind	28.85
	Og	0,0605	28.87	0,0149	28.60	0,0560	28.59
	Ol	ind	28.74	ind	27.96	ind	28.97
	Oa	ind	28.81	ind	28.49	ind	29.02

		<i>DNAIQ</i> (ng/μl) IPC		<i>Chelex</i> (ng/μl) IPC		<i>QIAamp Investigator</i> (ng/μl) IPC	
Após 2ª lavagem com lixívia	Ng	ind	28.73	ind	28.48	ind	28.91
	Nl	ind	28.94	ind	28.05	ind	28.46
	Na	ind	28.71	ind	28.51	ind	28.29
	Pg	0,0133	28.88	ind	28.45	ind	28.62
	Pl	ind	29.02	0,0064	28.05	ind	28.52
	Pa	ind	28.69	ind	28.81	ind	28.62
	Og	ind	28.45	ind	28.67	ind	28.78
	Ol	ind	28.59	ind	28.23	ind	28.80
	Oa	ind	29.25	ind	28.53	ind	29.00

Tabela 43 - Perfis genéticos obtidos das amostras lavadas com lixívia, extraídas pelos 3 métodos e amplificadas com os kits *AmpFℓSTR® Identifiler™*, *AmpFℓSTR® MiniFiler™* e *AmpFℓSTR® NGM SElect™*.

Amostra	Tipo	Tempo	Extração	Perfil Genético com Identifiler	Perfil Genético com Minifiler	Perfil Genético com NGM Se
1436	Pg	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1439	Og	1ª Lavagem	<i>Chelex</i>	n.a.	Completo	n.a.
1457	Og	1ª Lavagem	<i>QIAamp</i>	n.a.	Completo	n.a.
1475	Og	1ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Completo	n.a.
1481	Pg	2ª Lavagem	<i>DNAIQ</i>	n.a.	Sem perfil	Sem perfil

n.a. – não aplicável

7.2. Anexo II – Figuras

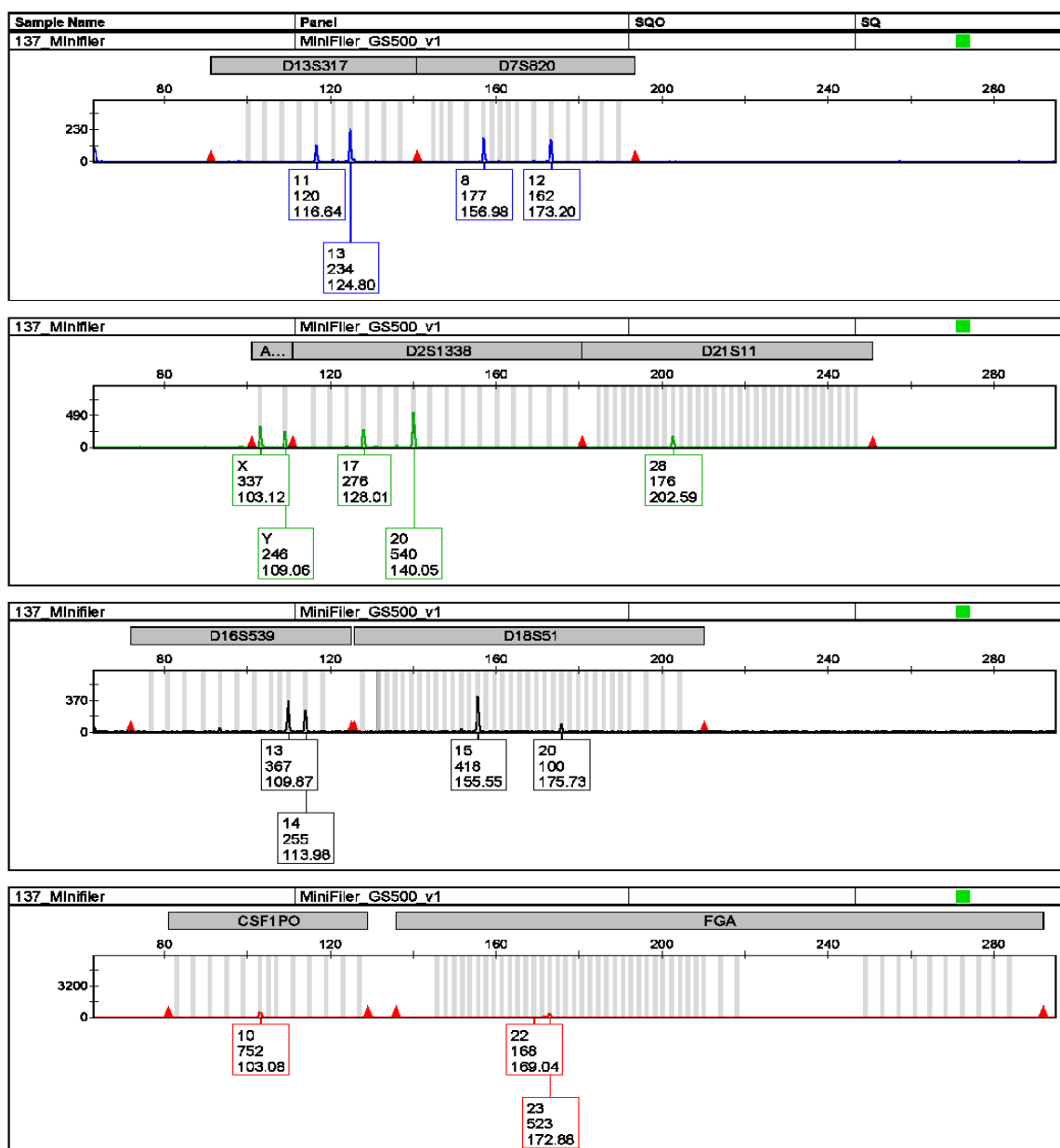


Figura 19. Perfil genético da amostra 137 extraída com o kit *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*

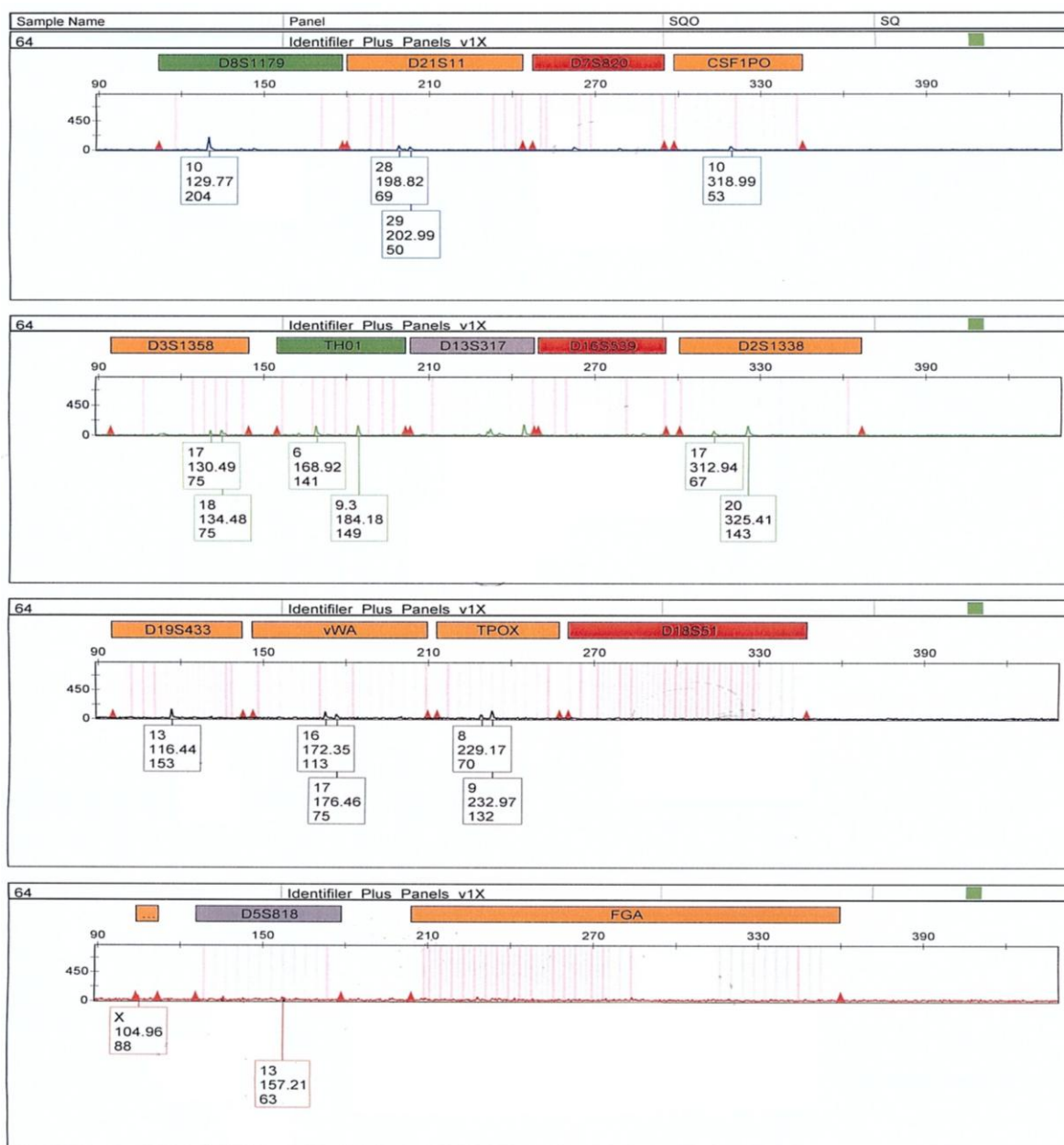


Figura 21. Perfil genético da amostra 64 extraída pelo *kit DNA IQ System* e amplificada com 10µl de produto extraído com o *kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

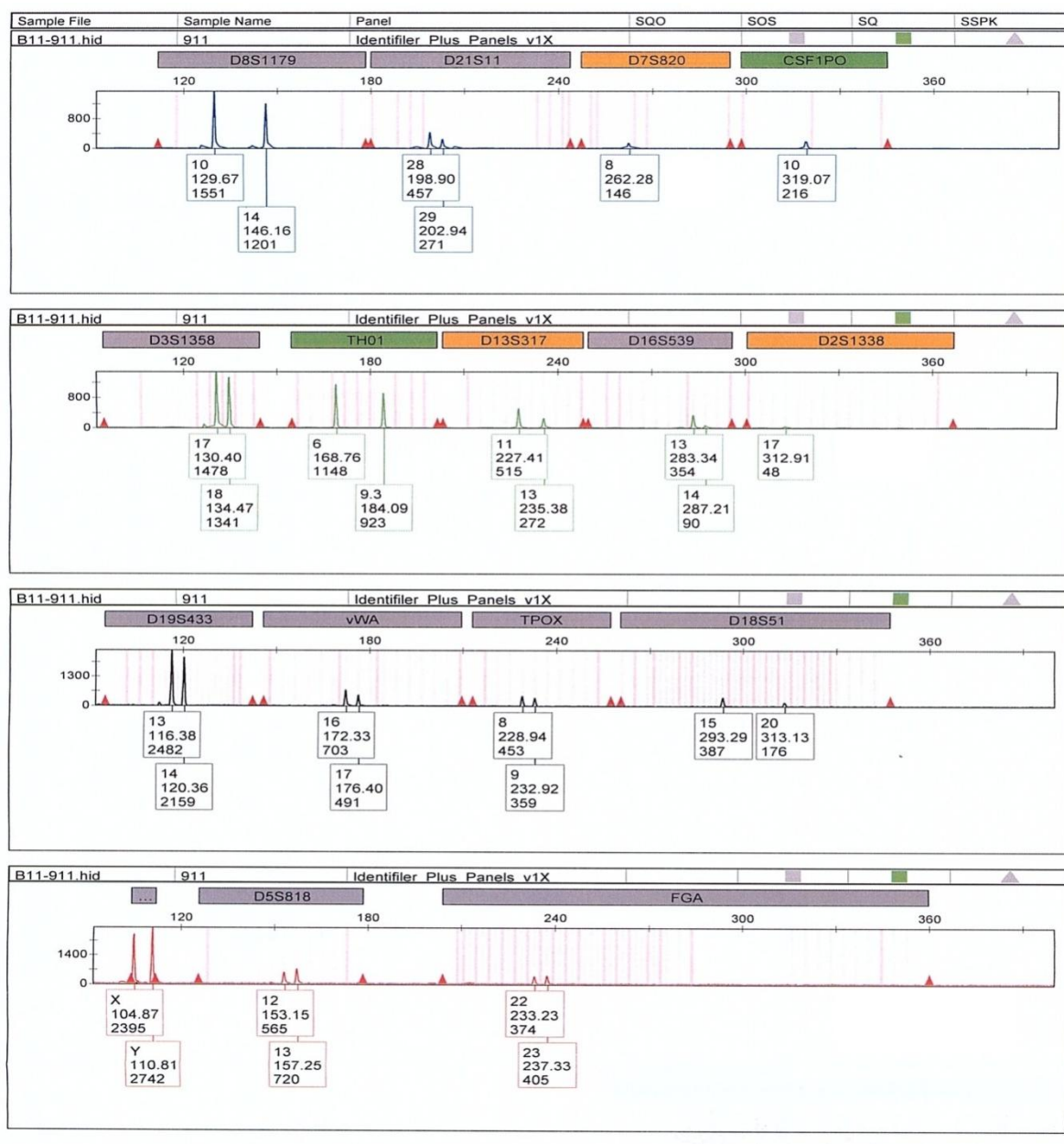


Figura 22. Perfil genético da amostra 911 extraída pelo método de *Chelex*, purificada com *Microcon*® e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*® *Identifiler*™ *Plus*

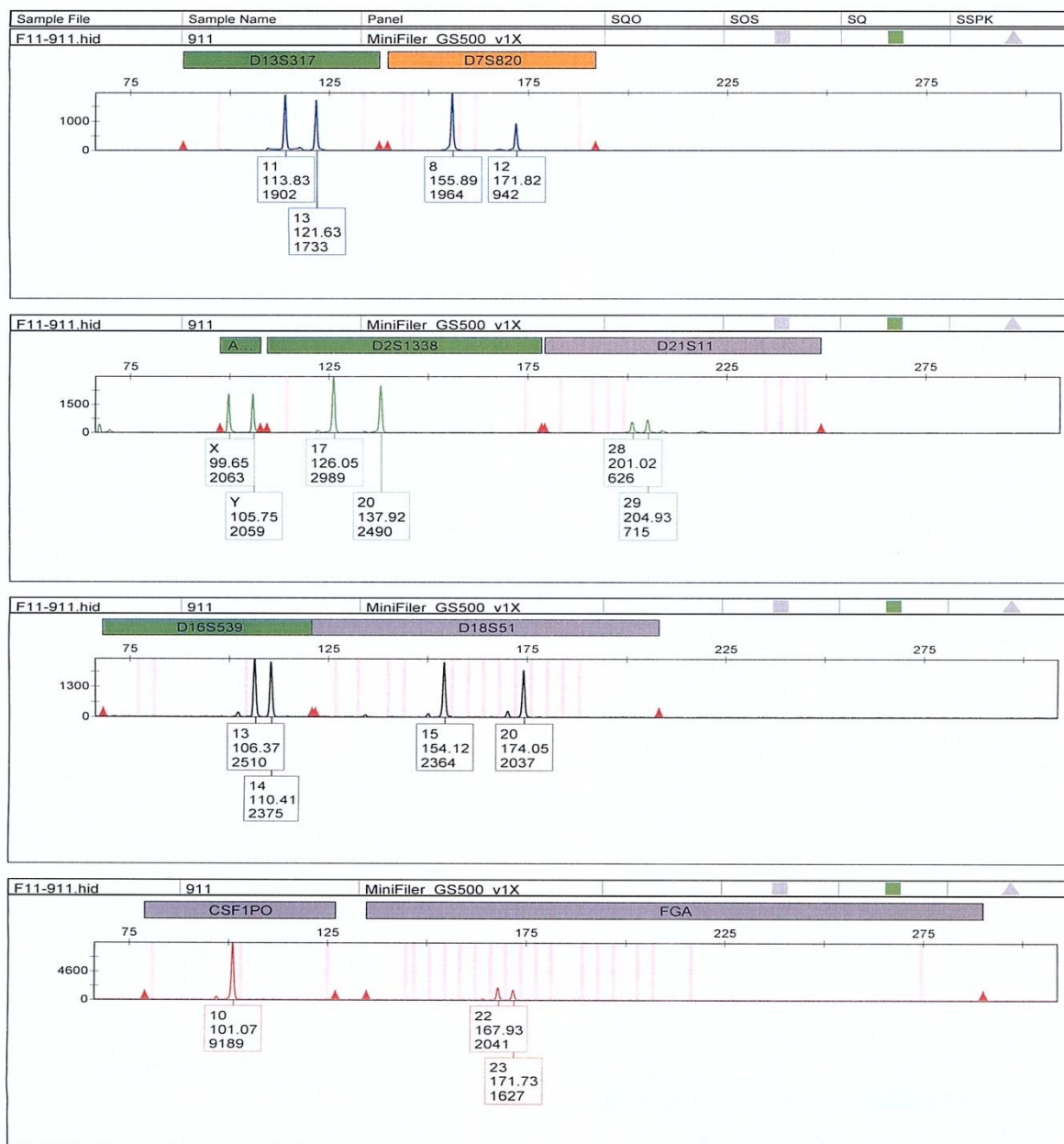


Figura 23. Perfil genético da amostra 911 extraída pelo método de *Chelex*, purificada com *Microcon*® e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*® *MiniFiler*™

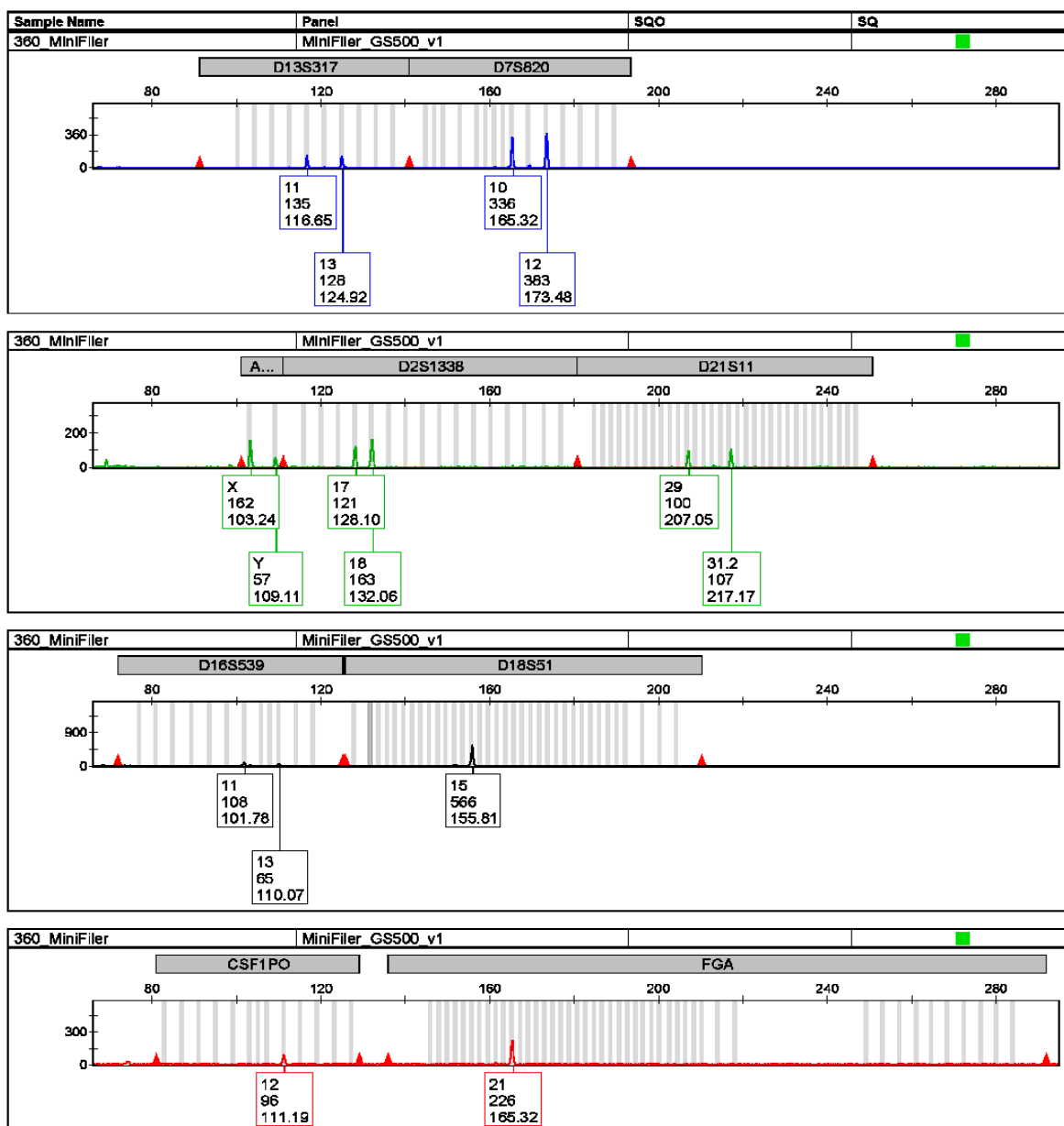


Figura 24. Perfil genético da amostra 360 extraída pelo *kit DNA IQ System* e amplificada com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*

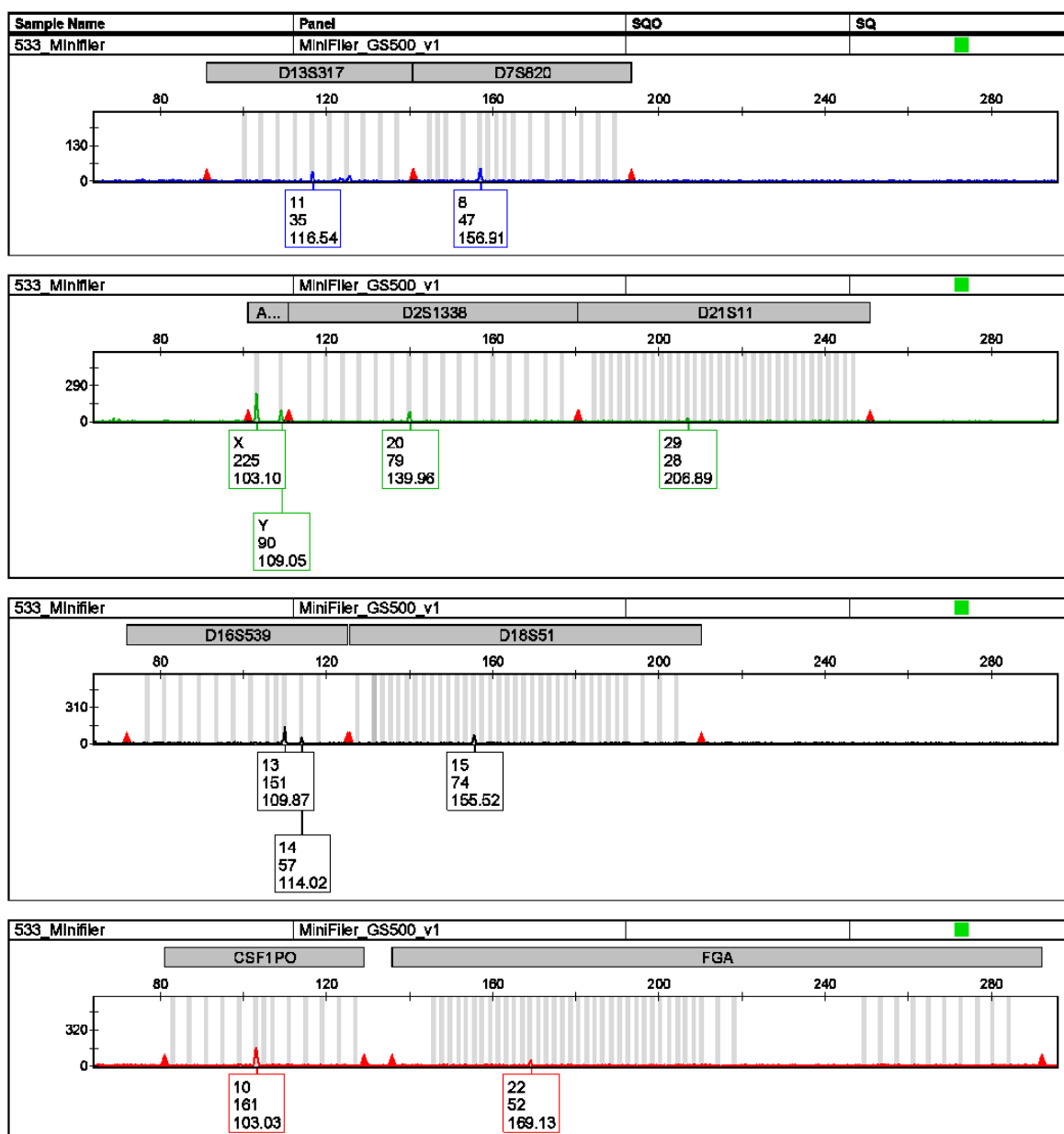


Figura 25. Perfil genético da amostra 533 extraída pelo kit *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*

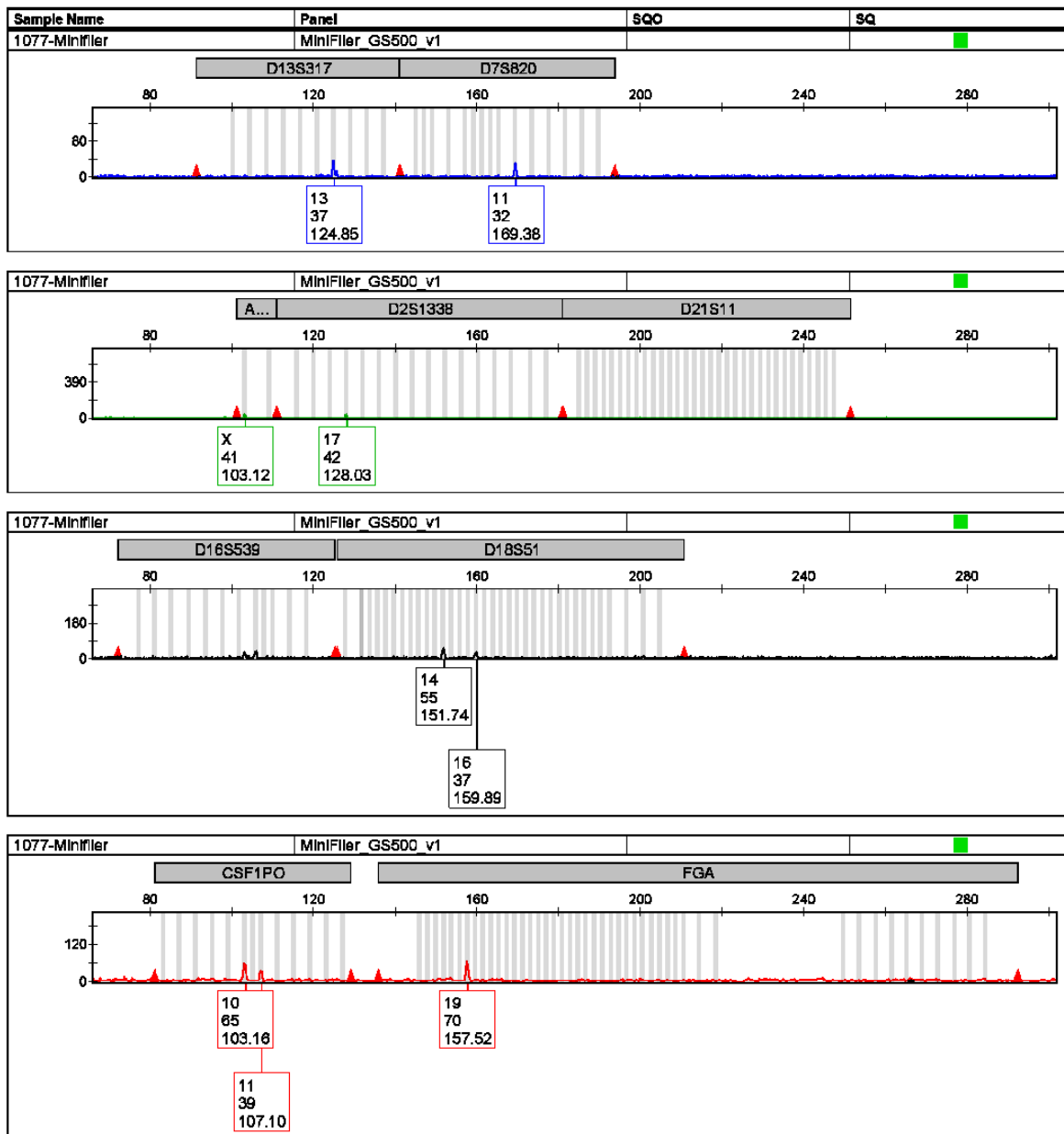


Figura 26. Perfil genético da amostra 1077 extraída pelo kit *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*

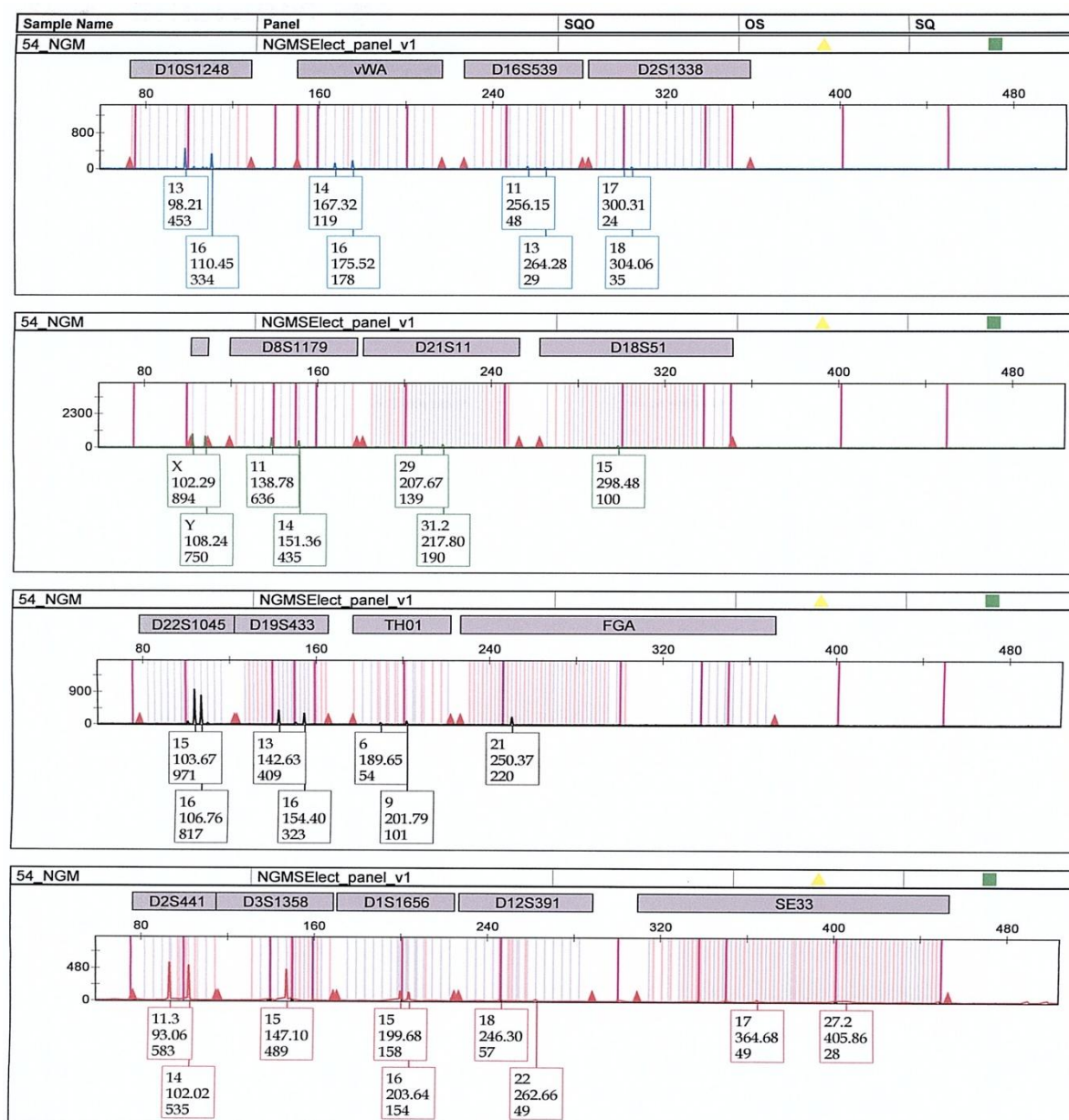


Figura 27. Perfil genético da amostra 54 extraída por *Chelex* , purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *NGM Select*[™]

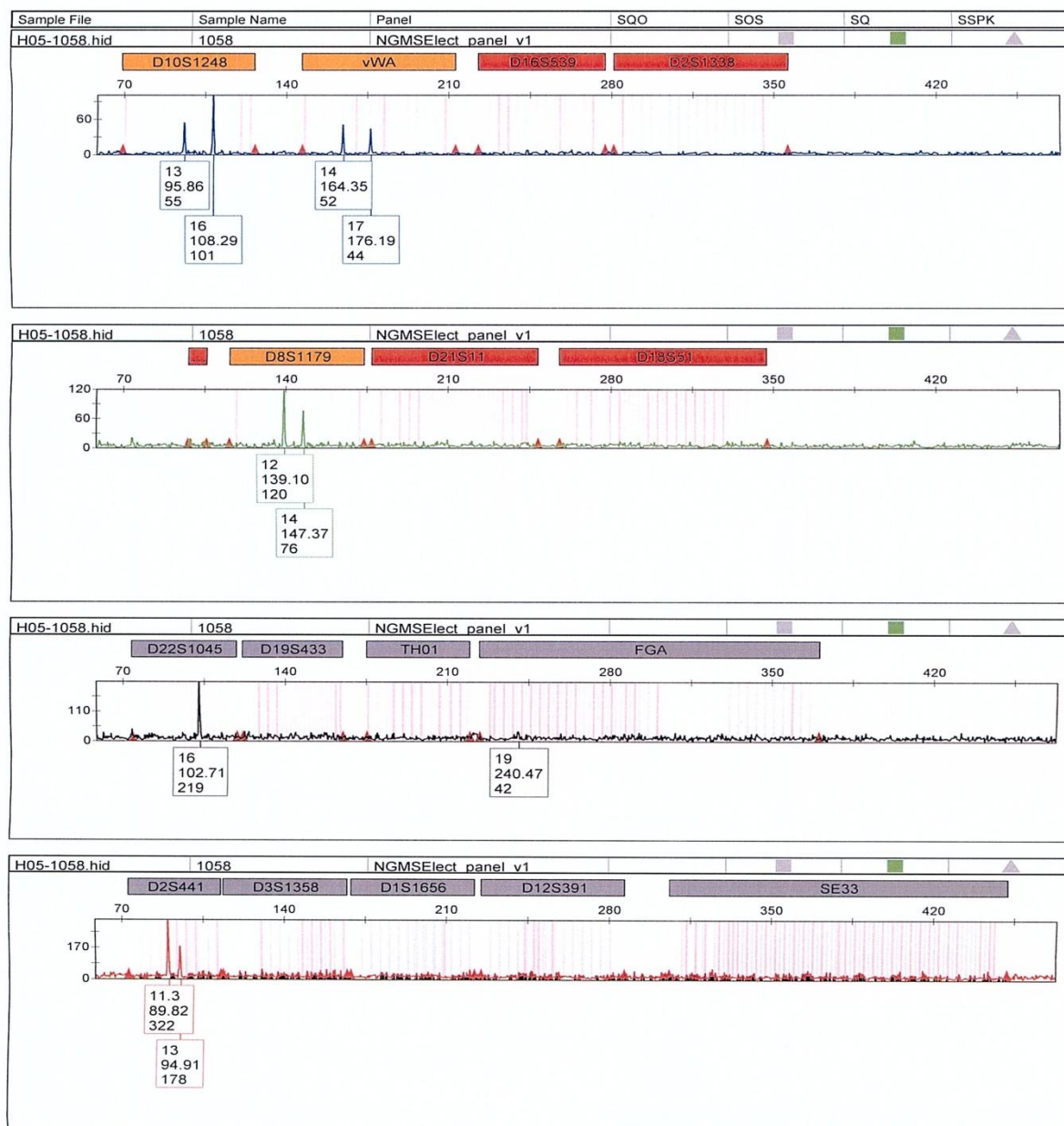


Figura 28. Perfil genético da amostra 1058 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *NGM SElect*[™]

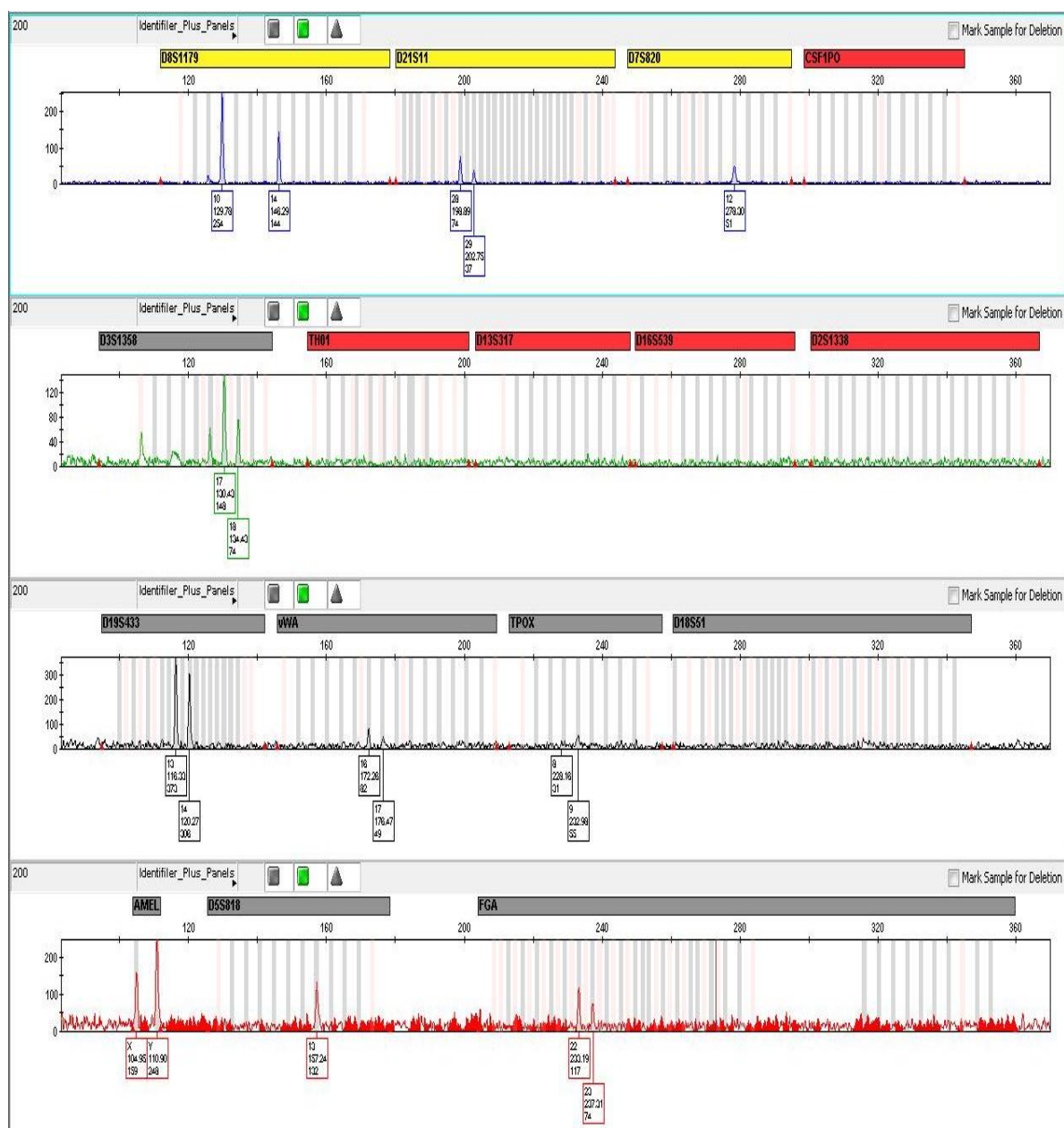


Figura 30. Perfil genético da amostra 200 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com 2µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler*[™] *Plus*

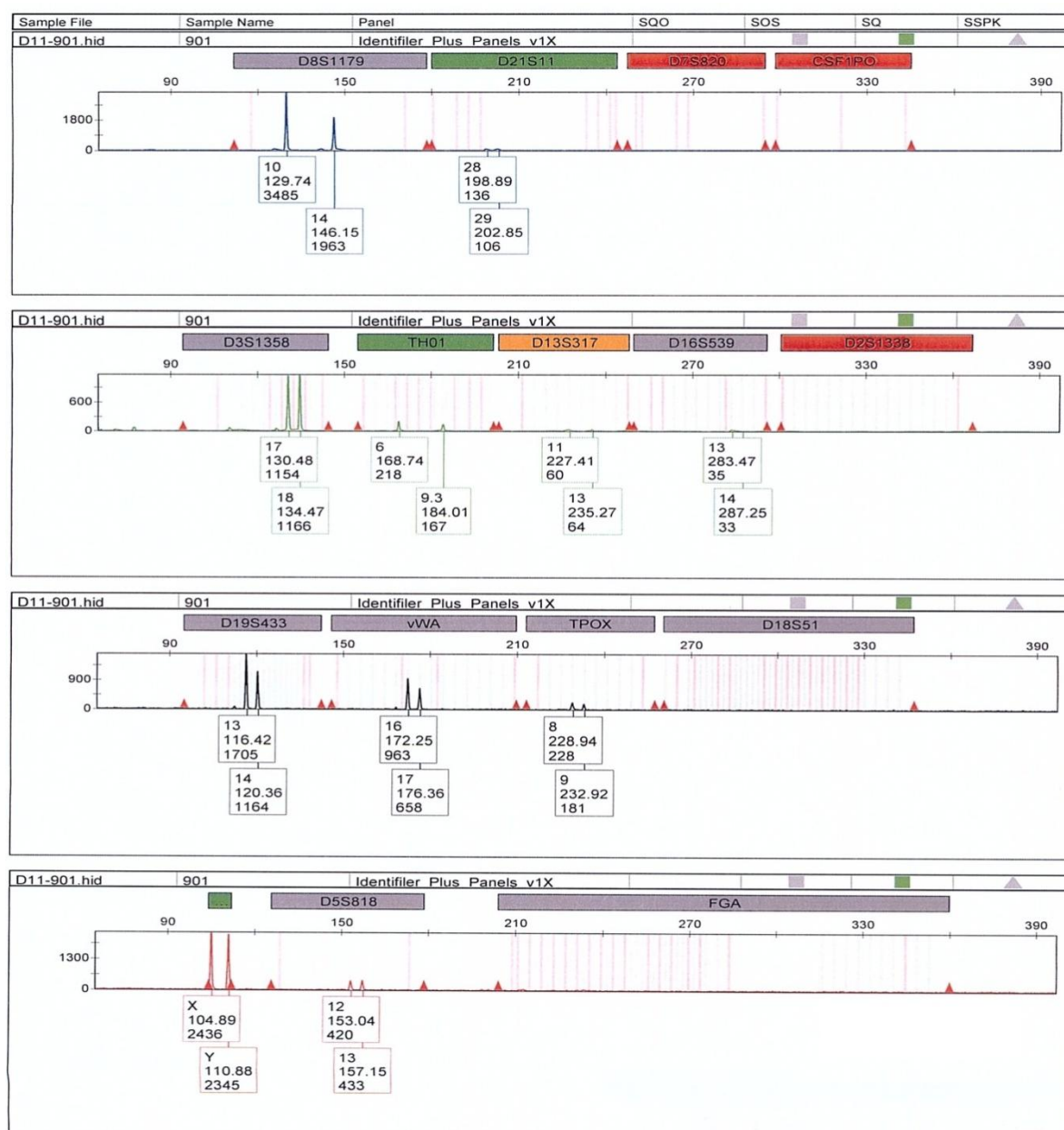


Figura 31. Perfil genético da amostra 901 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler*[™] *Plus*

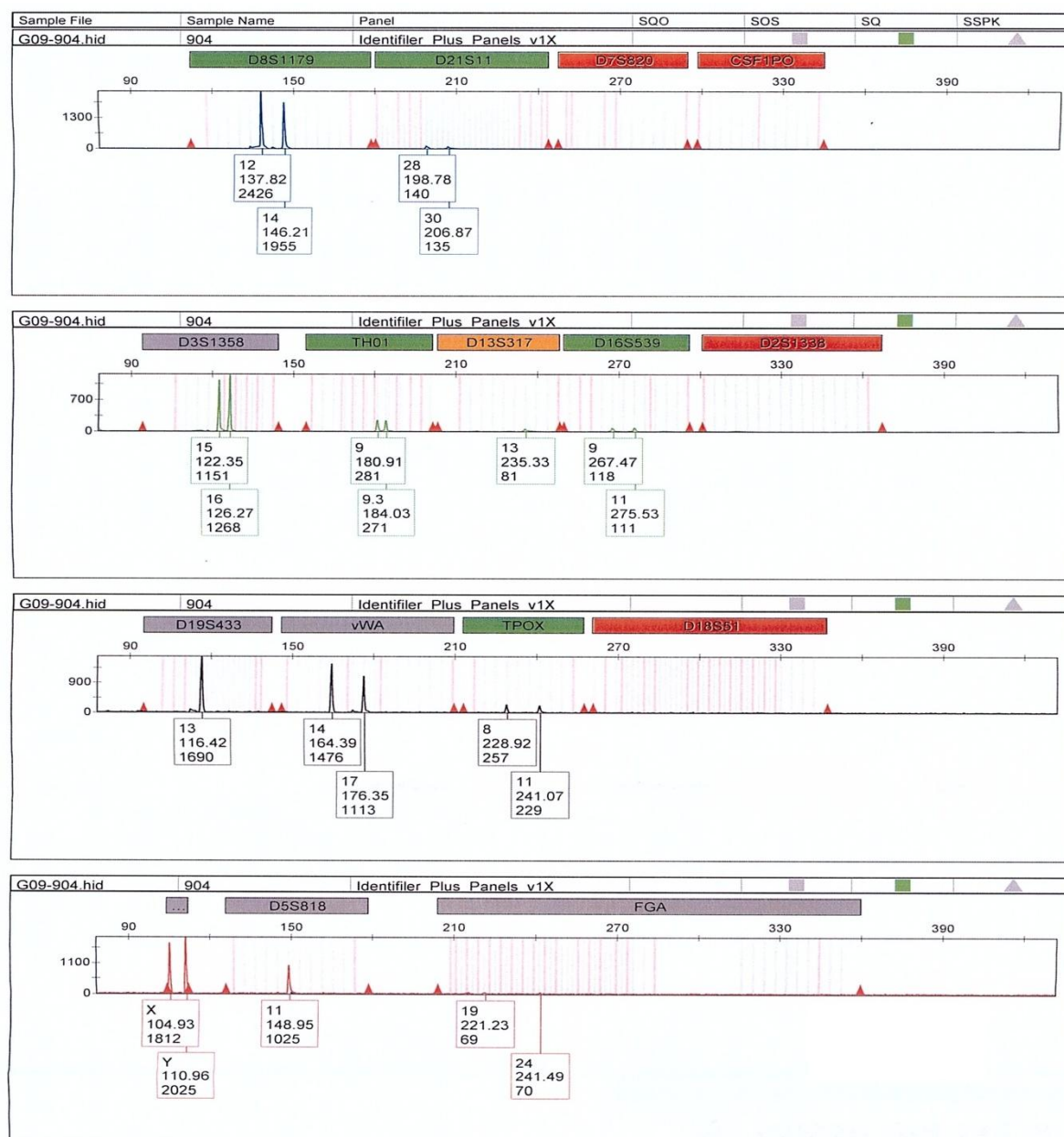


Figura 32. Perfil genético da amostra 904 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler™ Plus*

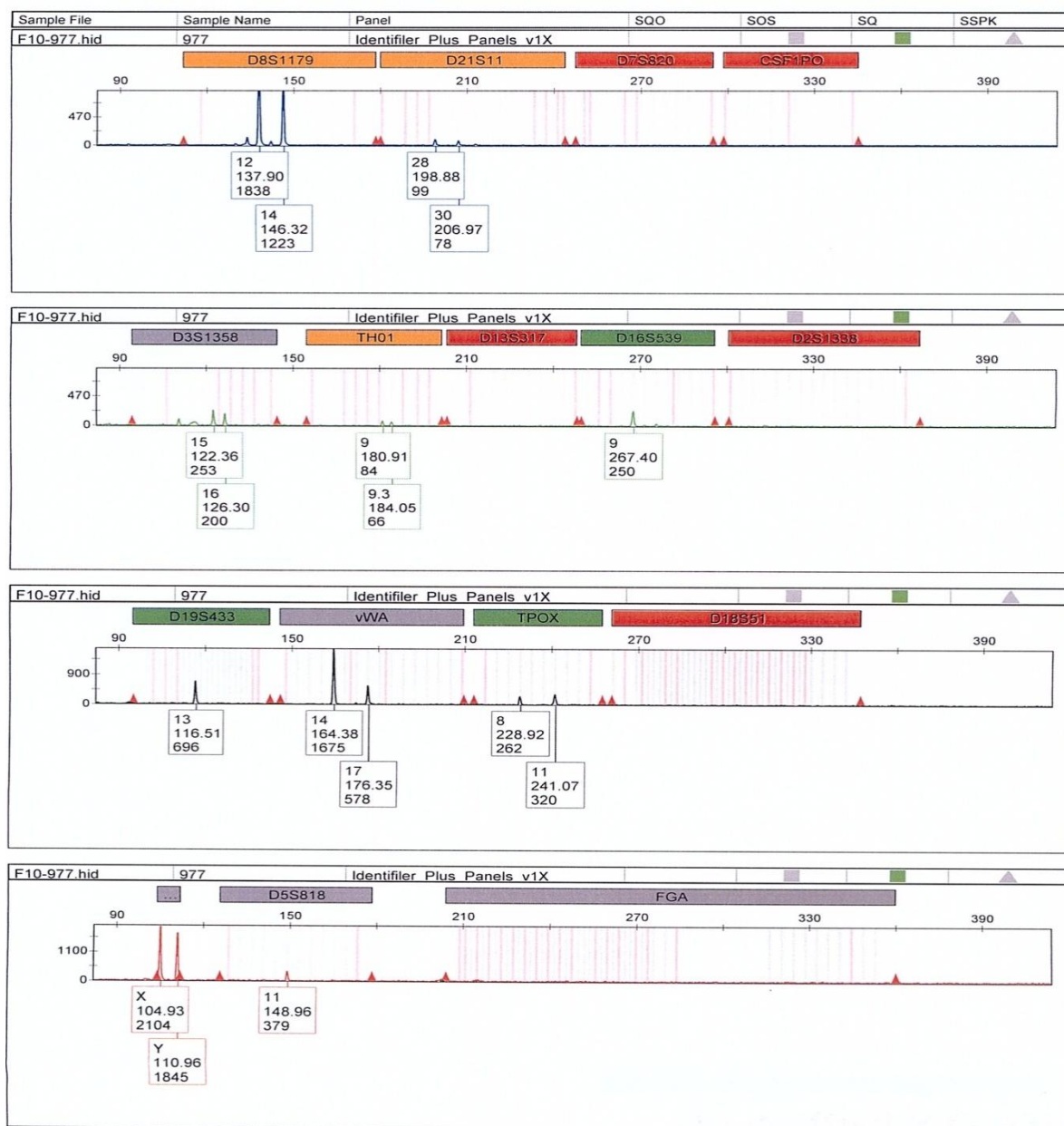


Figura 33. Perfil genético da amostra 977 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *Identifiler*[™] *Plus*

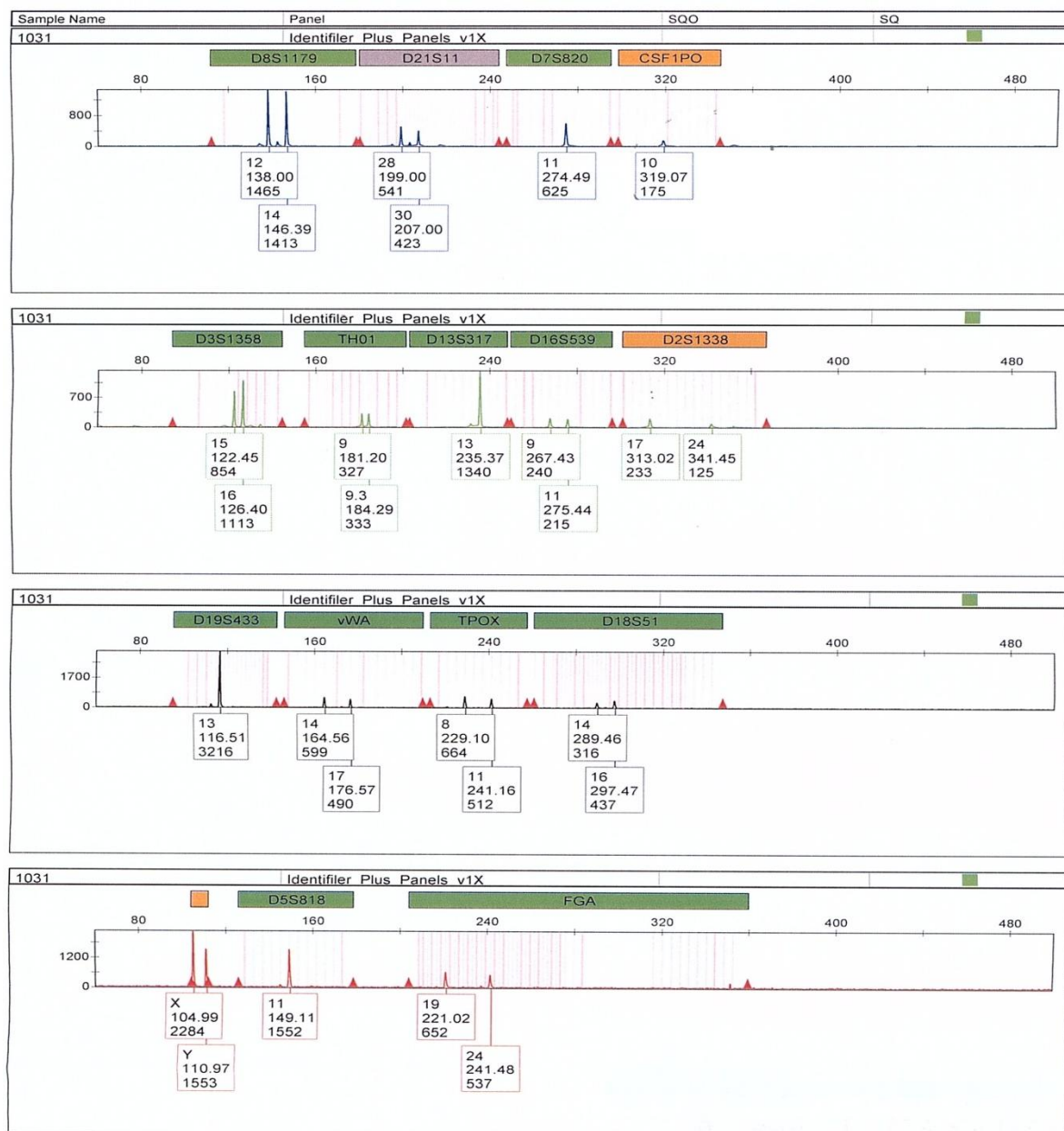


Figura 34. Perfil genético da amostra 1031 extraída pelo kit *QIAamp DNA Investigator* amplificada com o kit *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus*

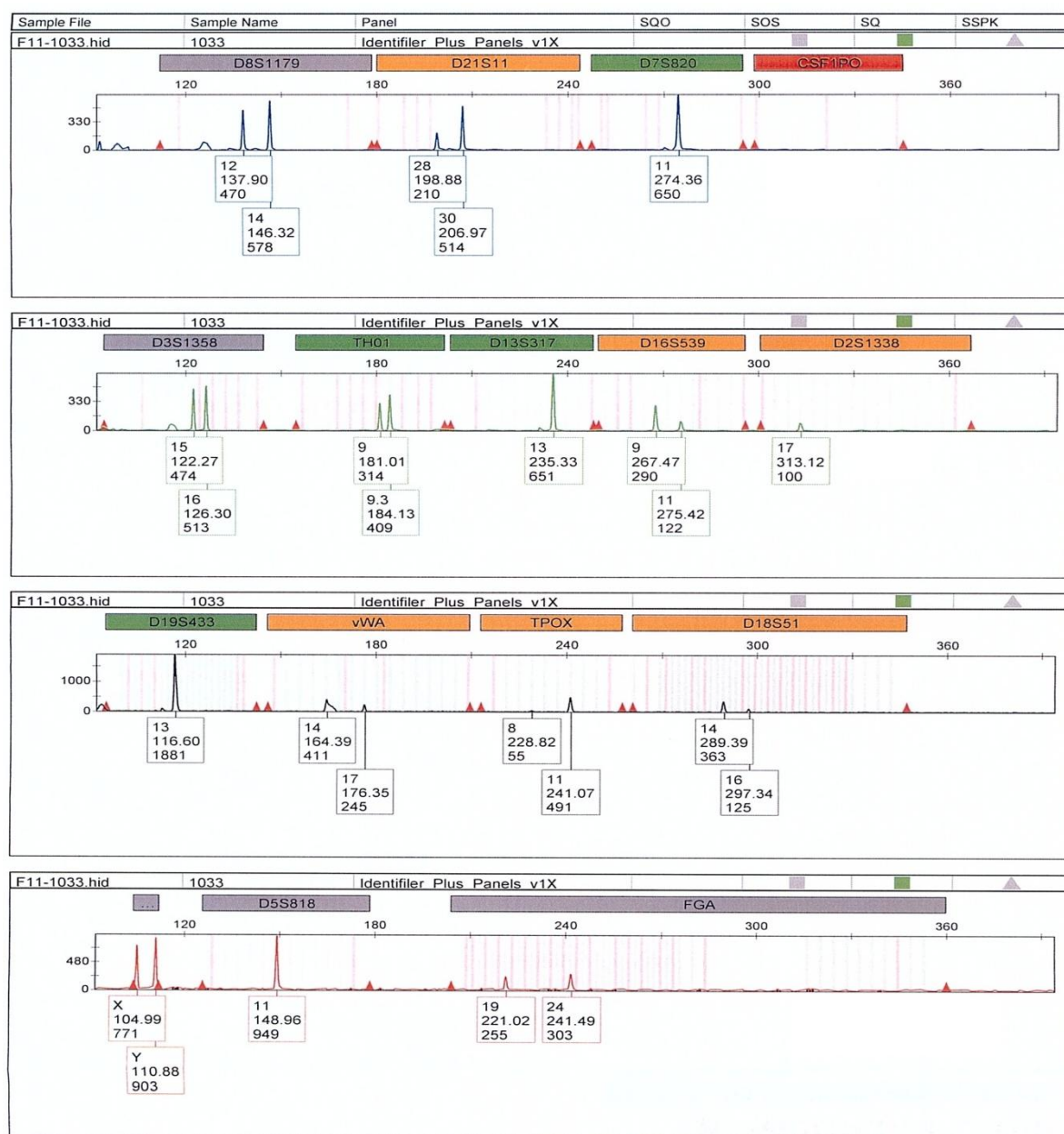


Figura 35. Perfil genético da amostra 1033 extraída pelo kit *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

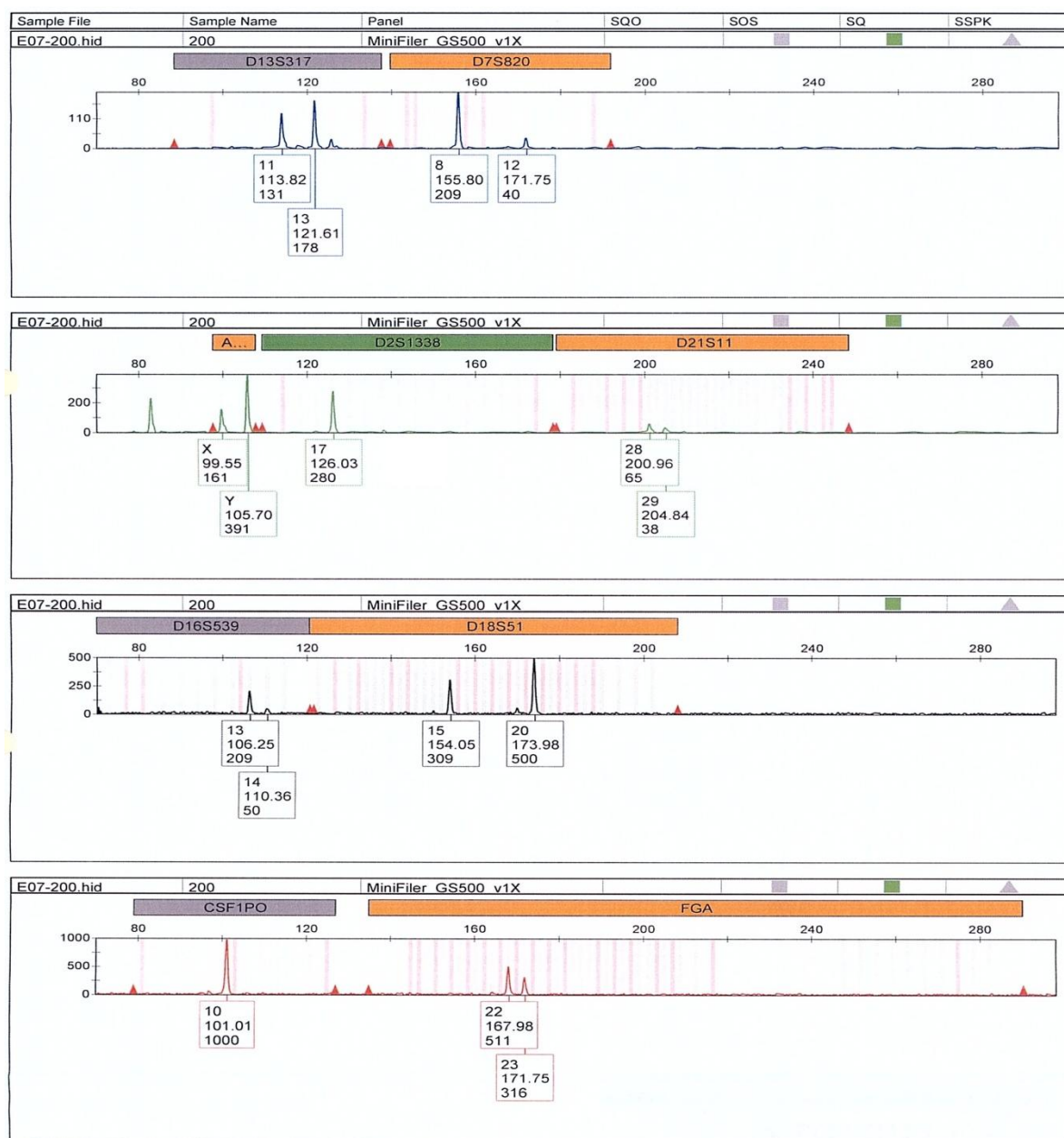


Figura 36. Perfil genético da amostra 200 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™]



Figura 37. Perfil genético da amostra 904 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *NGM SElect*[™]

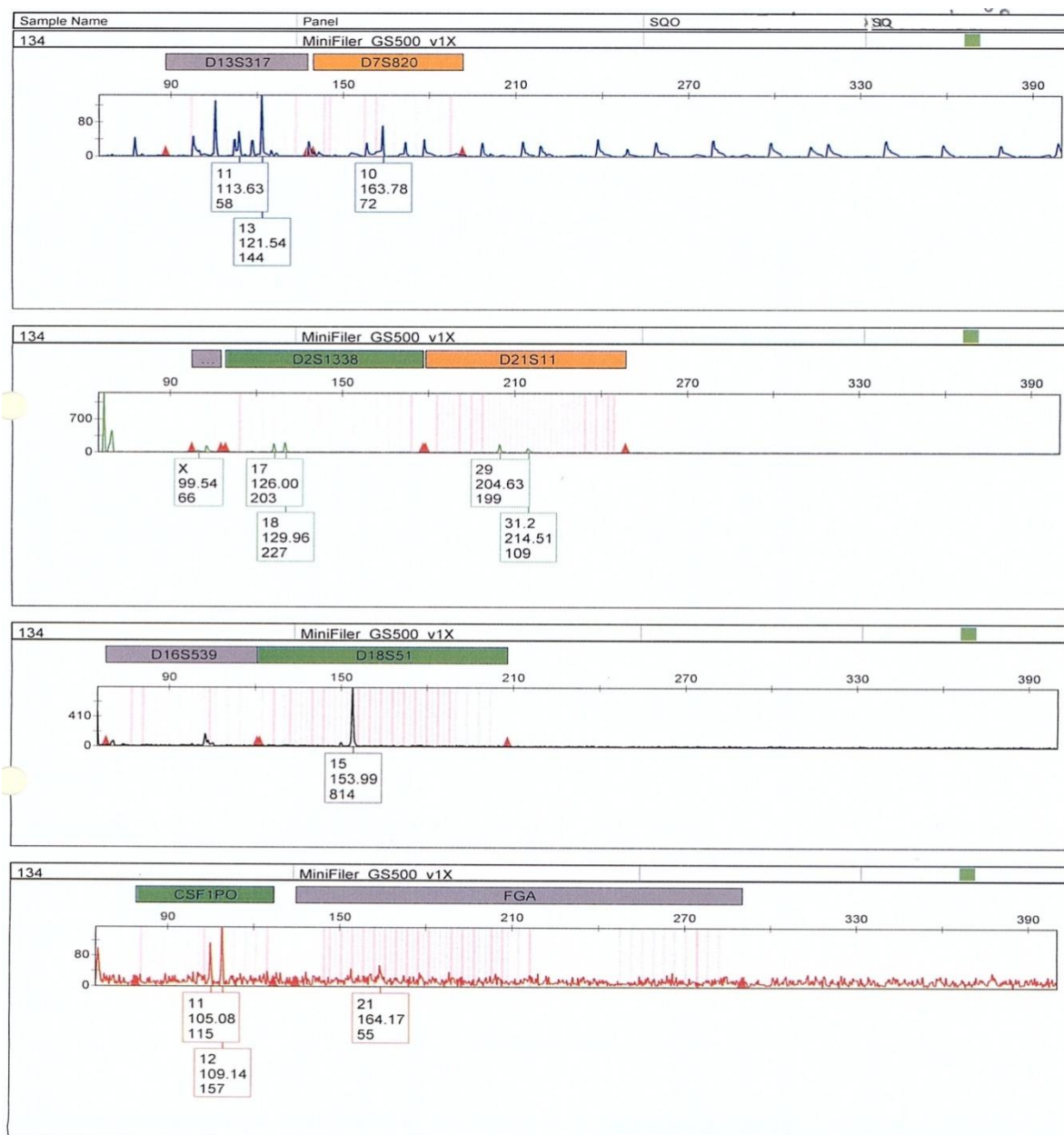


Figura 38. Perfil genético da amostra 134 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*® e NaOH e amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR*® *MiniFiler*™

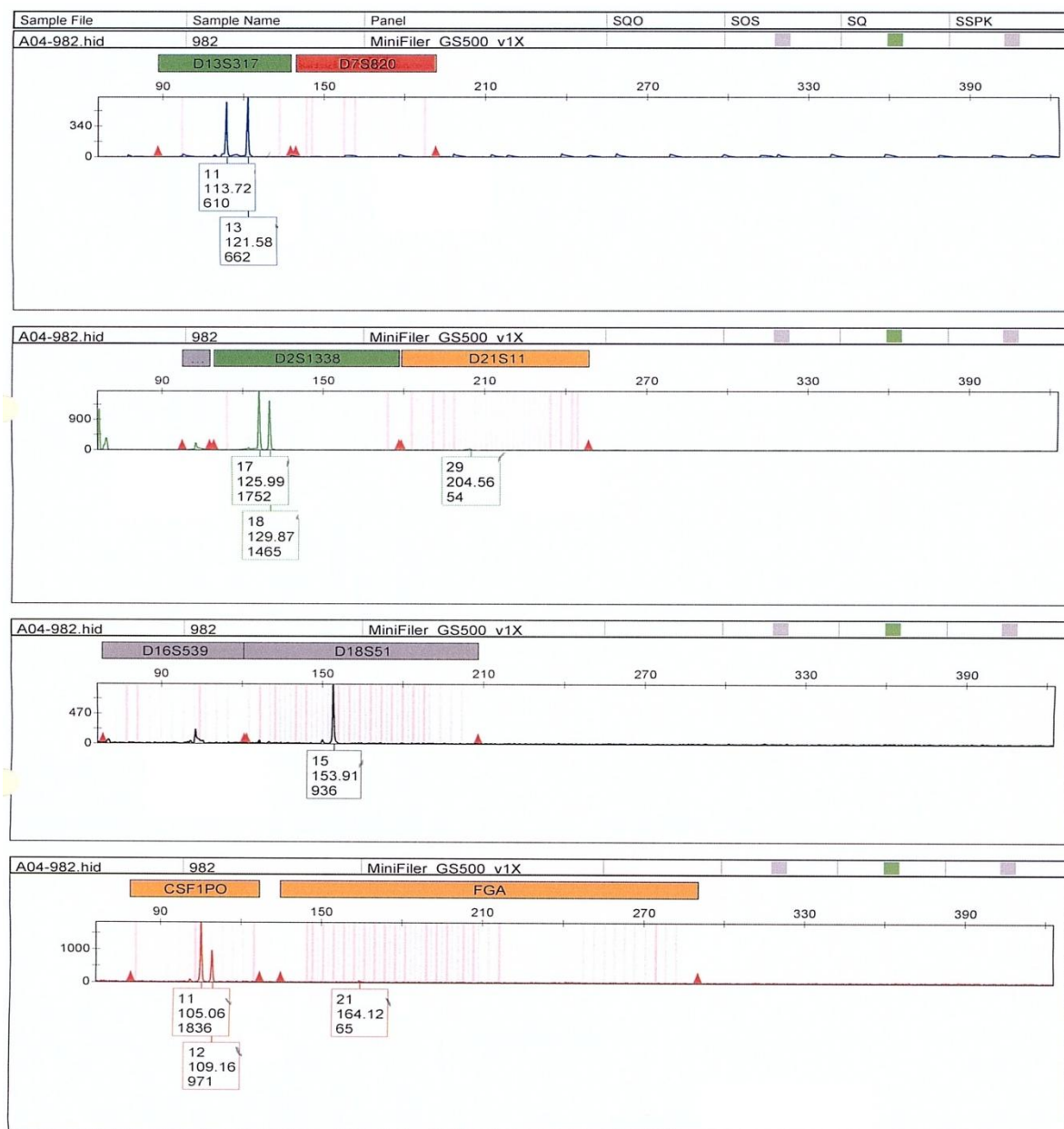


Figura 39. Perfil genético da amostra 982 extraída por *Chelex*, purificada com *Microcon*[®] e NaOH e amplificada com o kit *AmpFℓSTR*[®] *MiniFiler*[™]

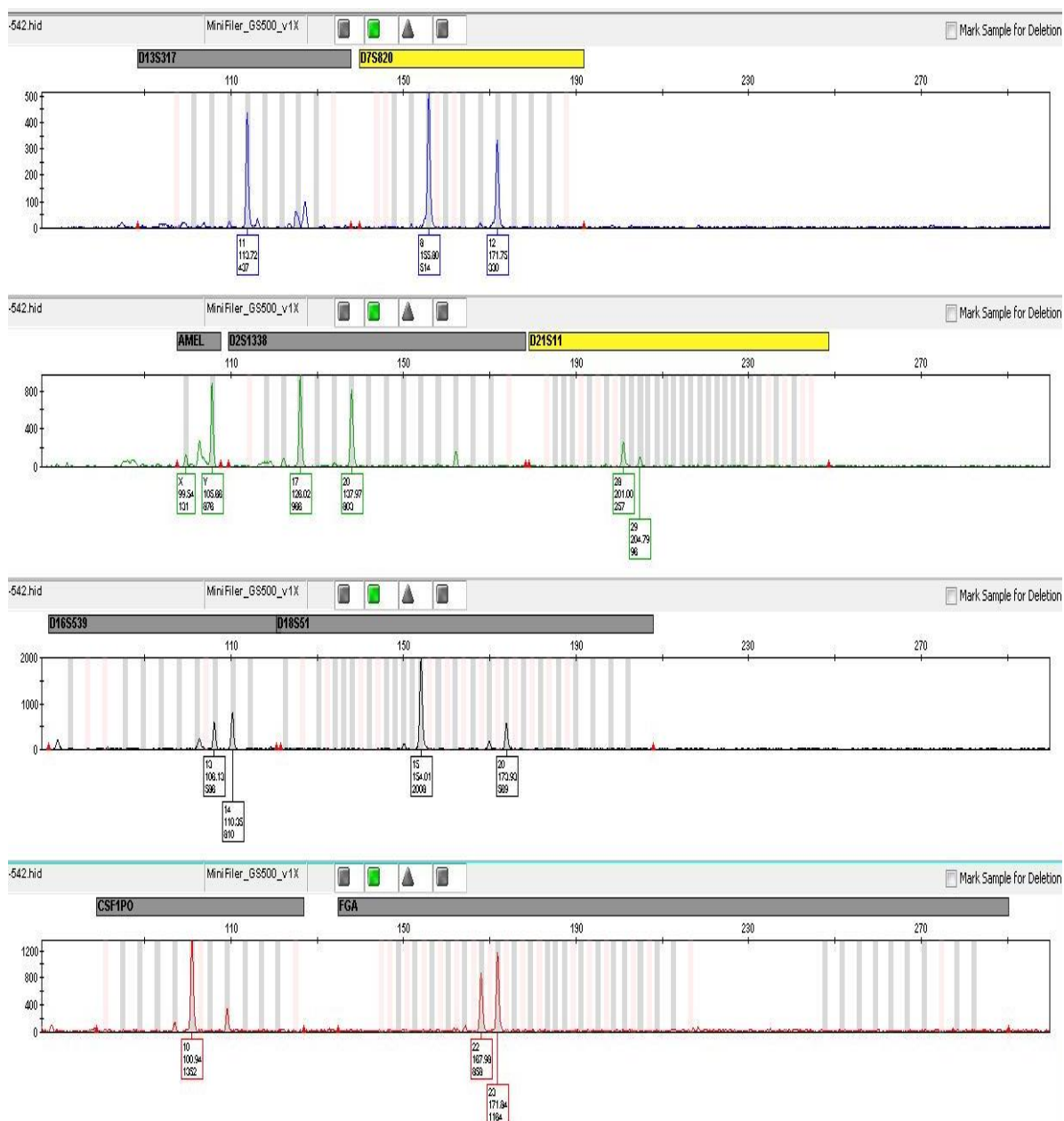


Figura 40. Perfil genético da amostra 542 extraída por *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR® MiniFiler™*

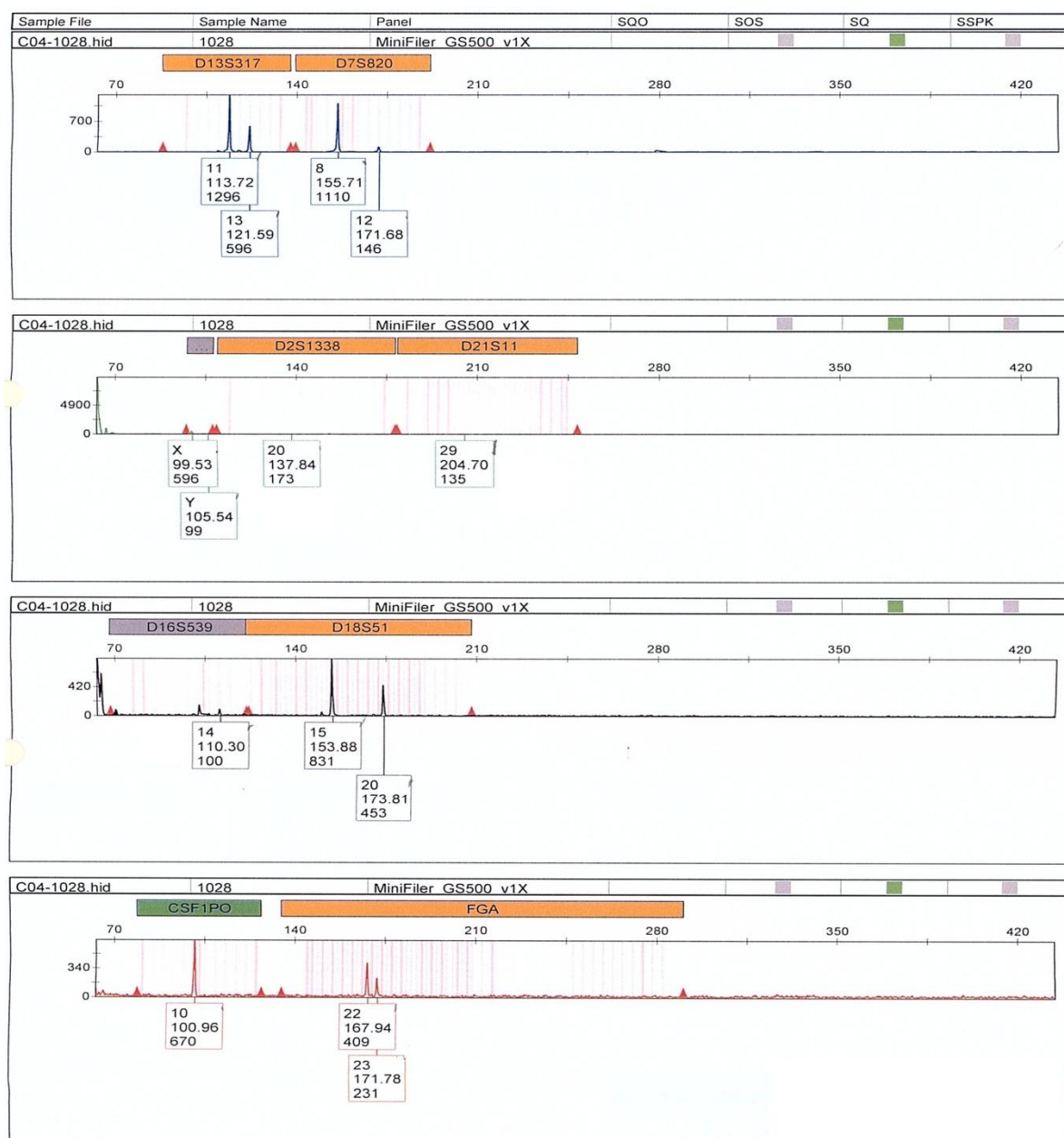


Figura 41. Perfil genético da amostra 1028 extraída por *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*

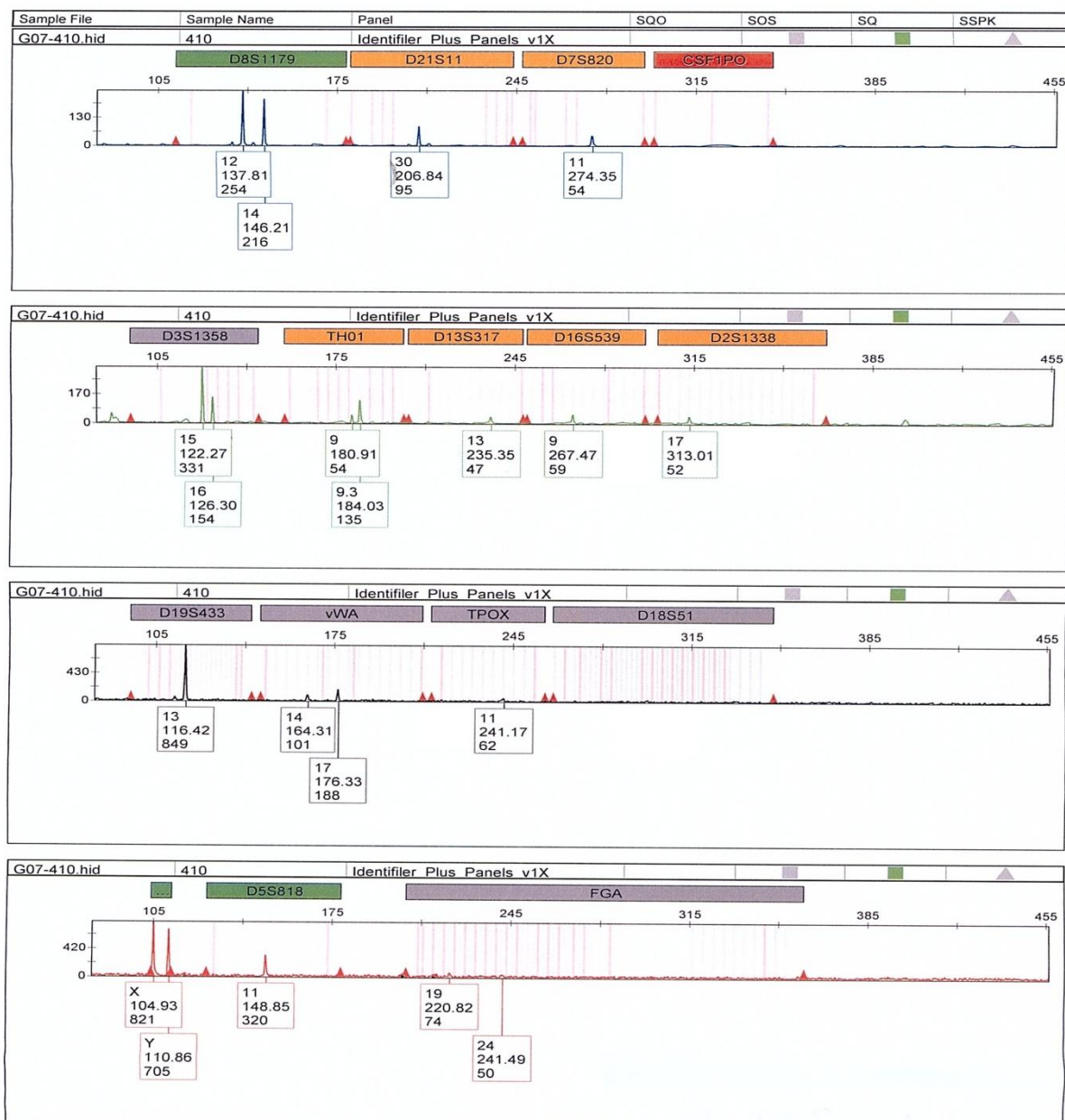


Figura 43. Perfil genético da amostra 410 extraída por *Chelex*, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit AmpFℓSTR® Identifier™ Plus

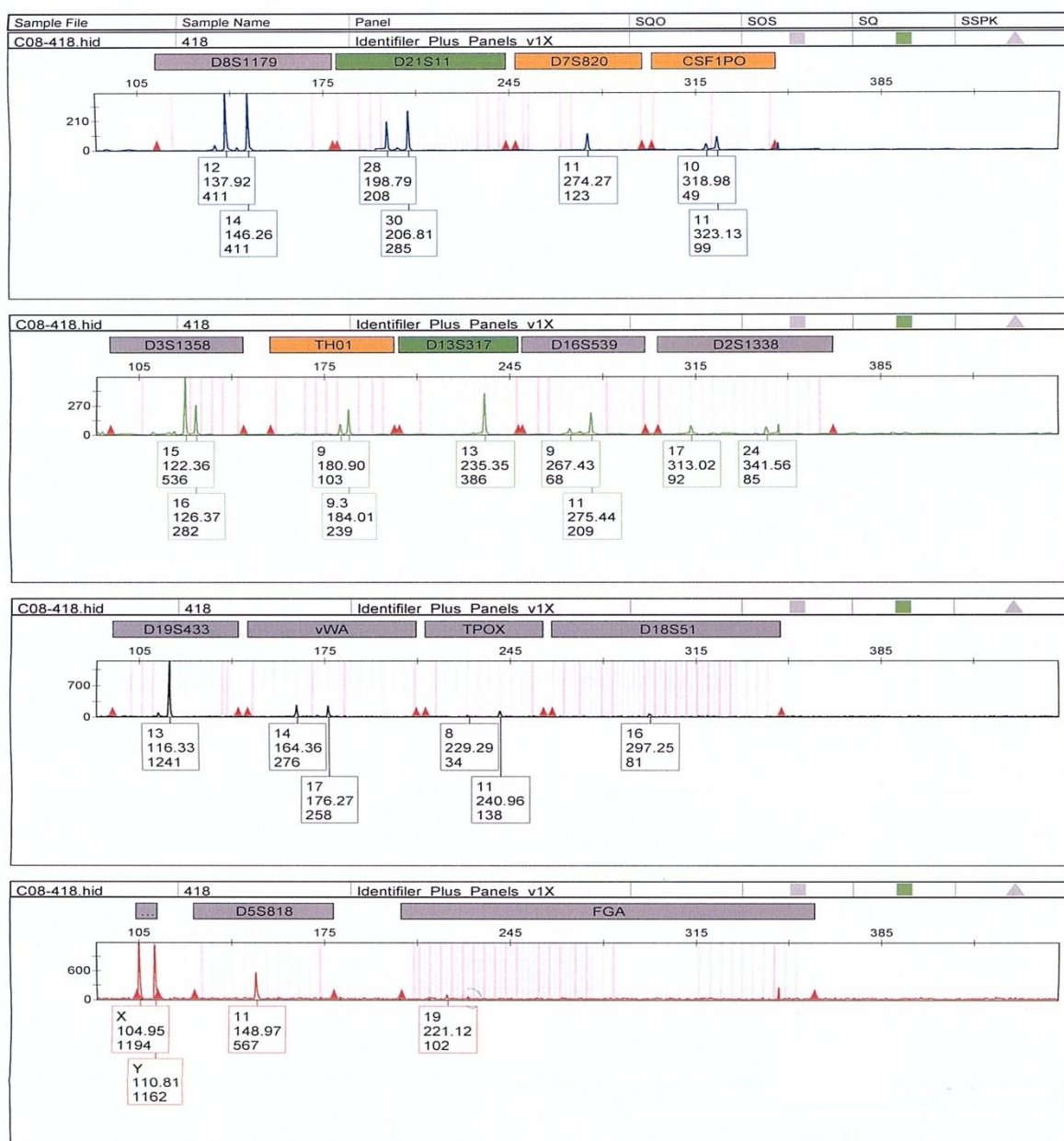


Figura 44. Perfil genético da amostra 418 extraída por *Chelex*, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

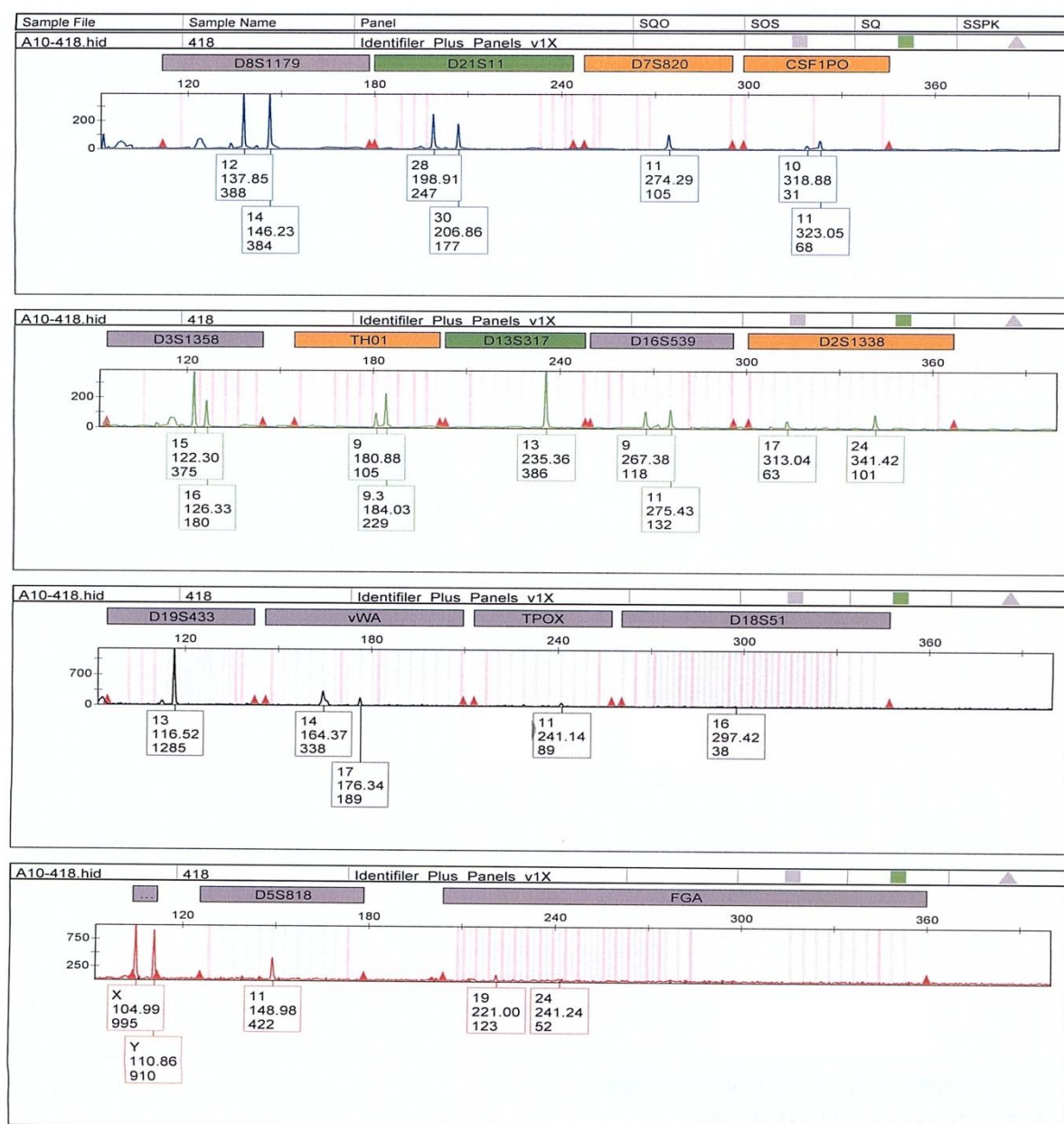


Figura 45. Perfil genético da amostra 418 extraída por *Chelex*, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

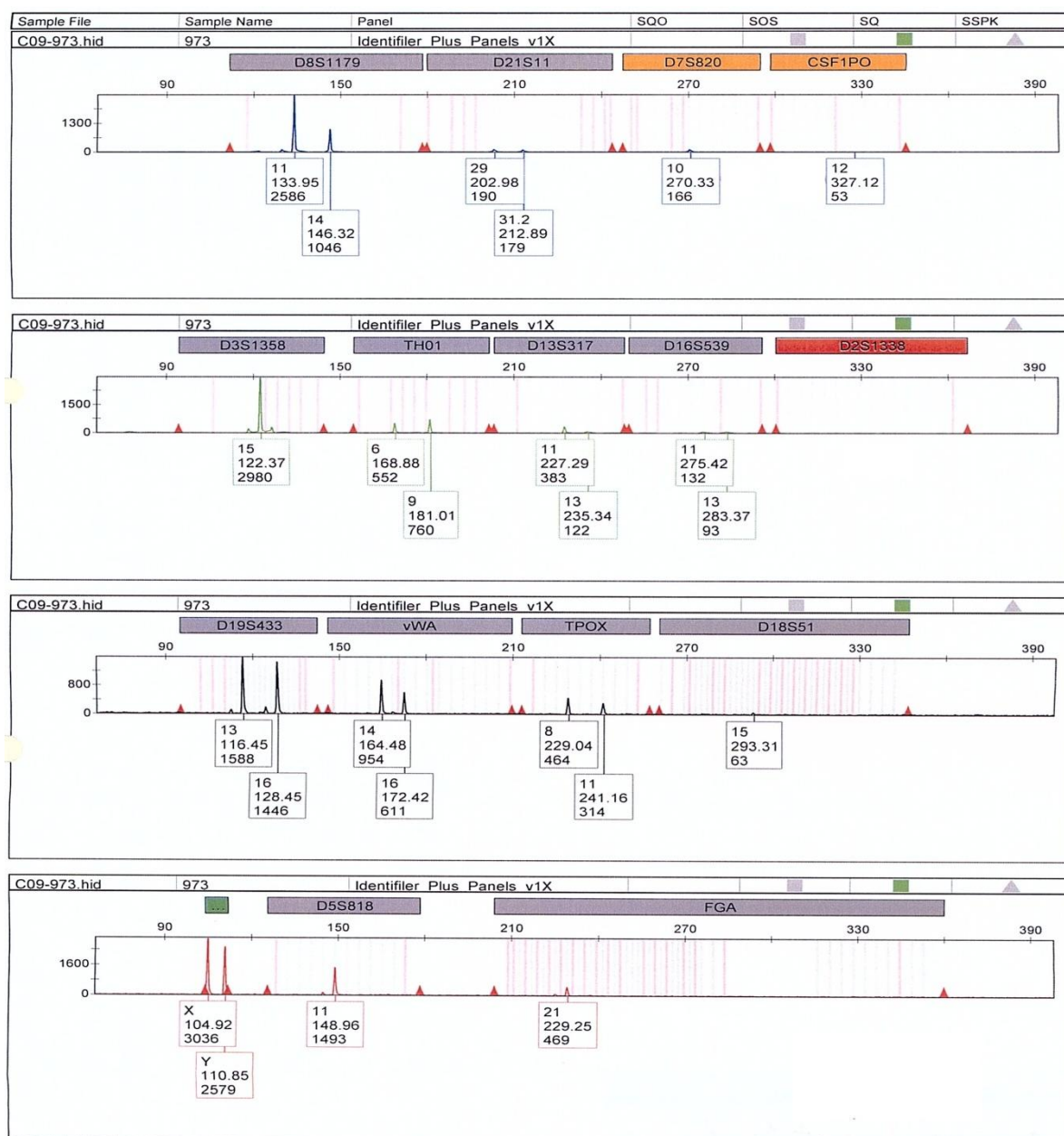


Figura 46. Perfil genético da amostra 973 extraída por *Chelex*, amplificada com 3µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

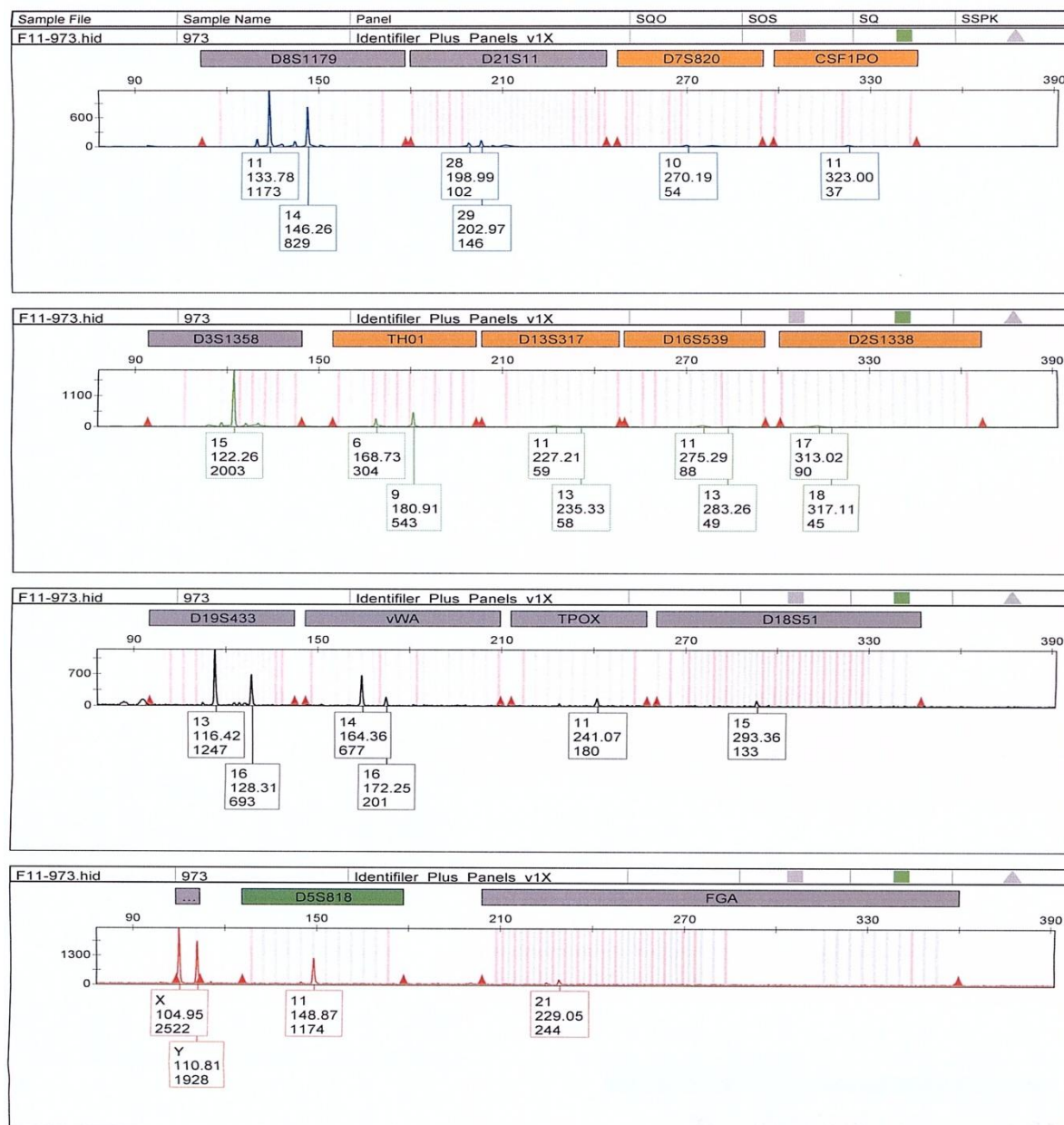


Figura 47. Perfil genético da amostra 973 extraída por *Chelex*, amplificada com 6µl de produto extraído com o kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus

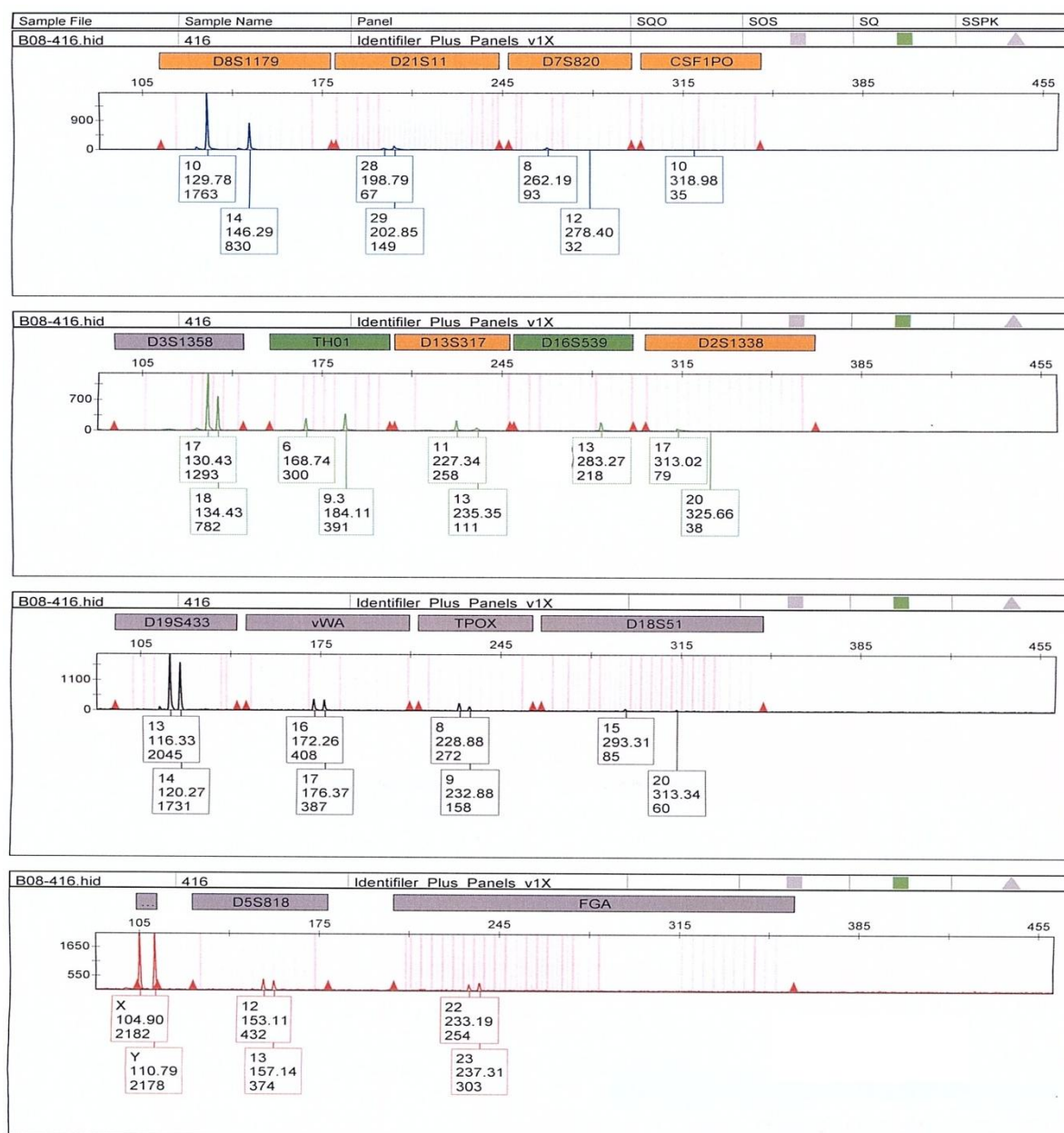


Figura 48. Perfil genético da amostra 416 extraída por *Chelex*, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

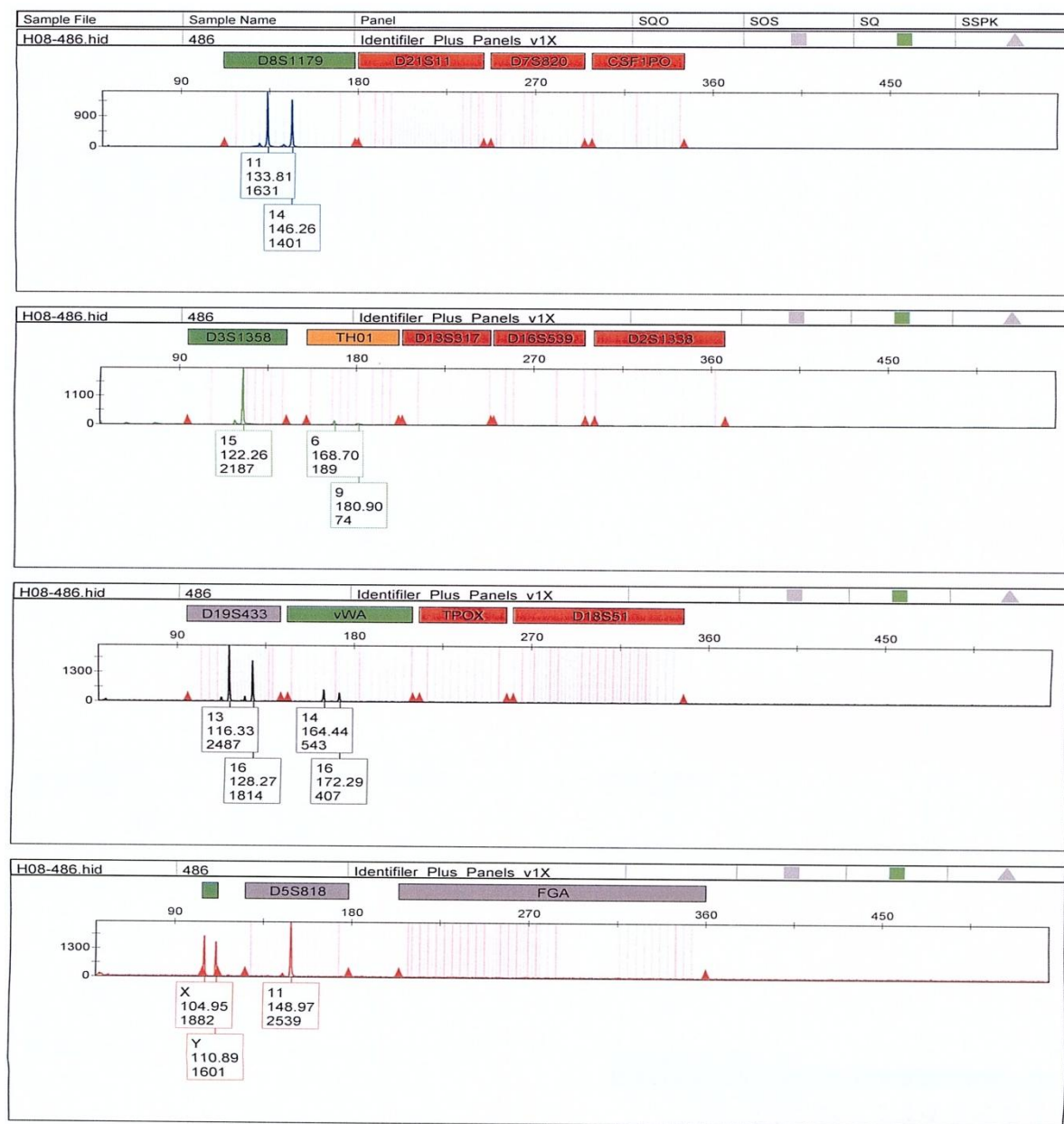


Figura 49. Perfil genético da amostra 486 extraída por DNA IQ System, amplificada com 4µl de produto extraído com o kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus

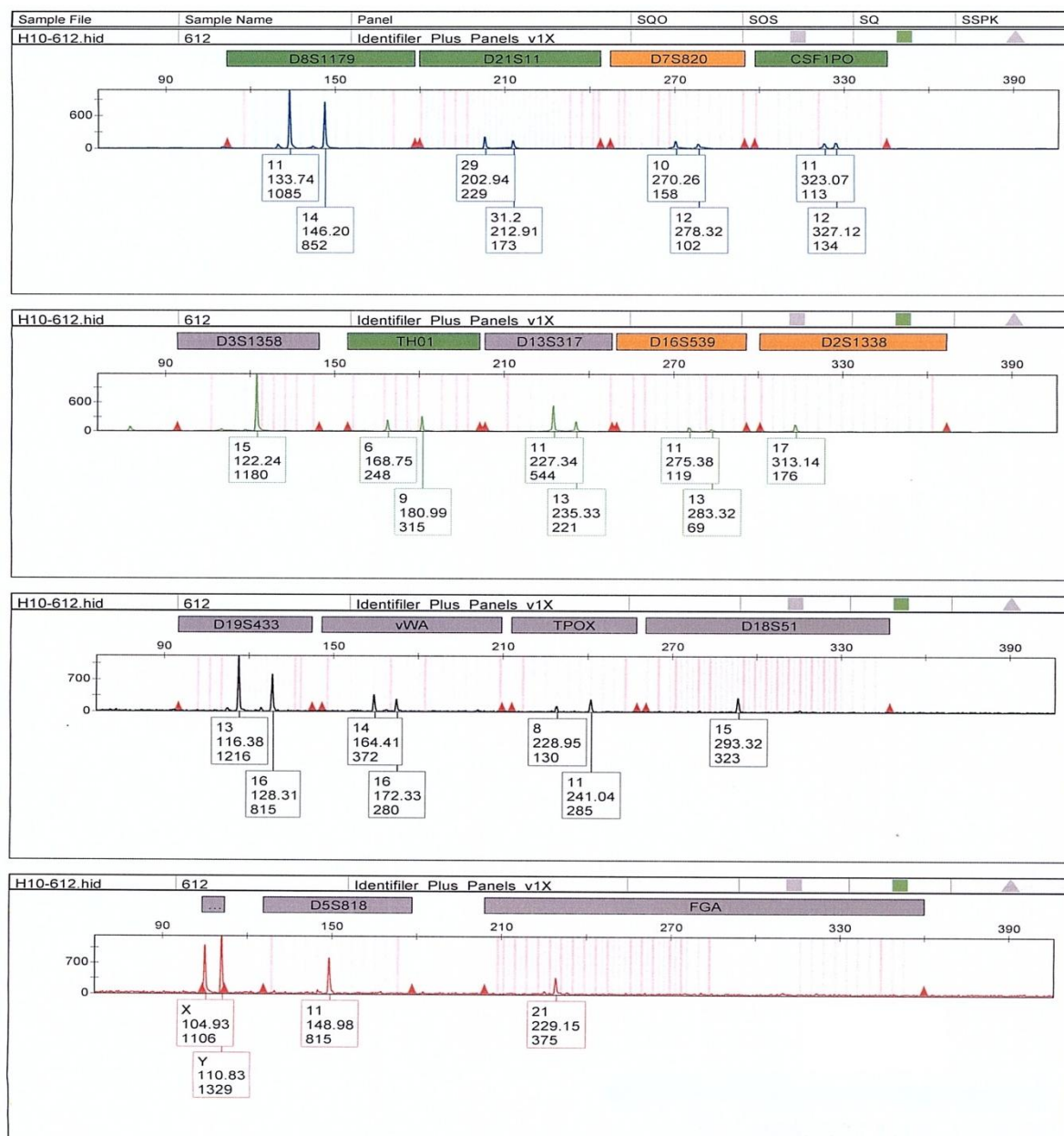


Figura 50. Perfil genético da amostra 612 extraída por *QIAamp DNA Investigator* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

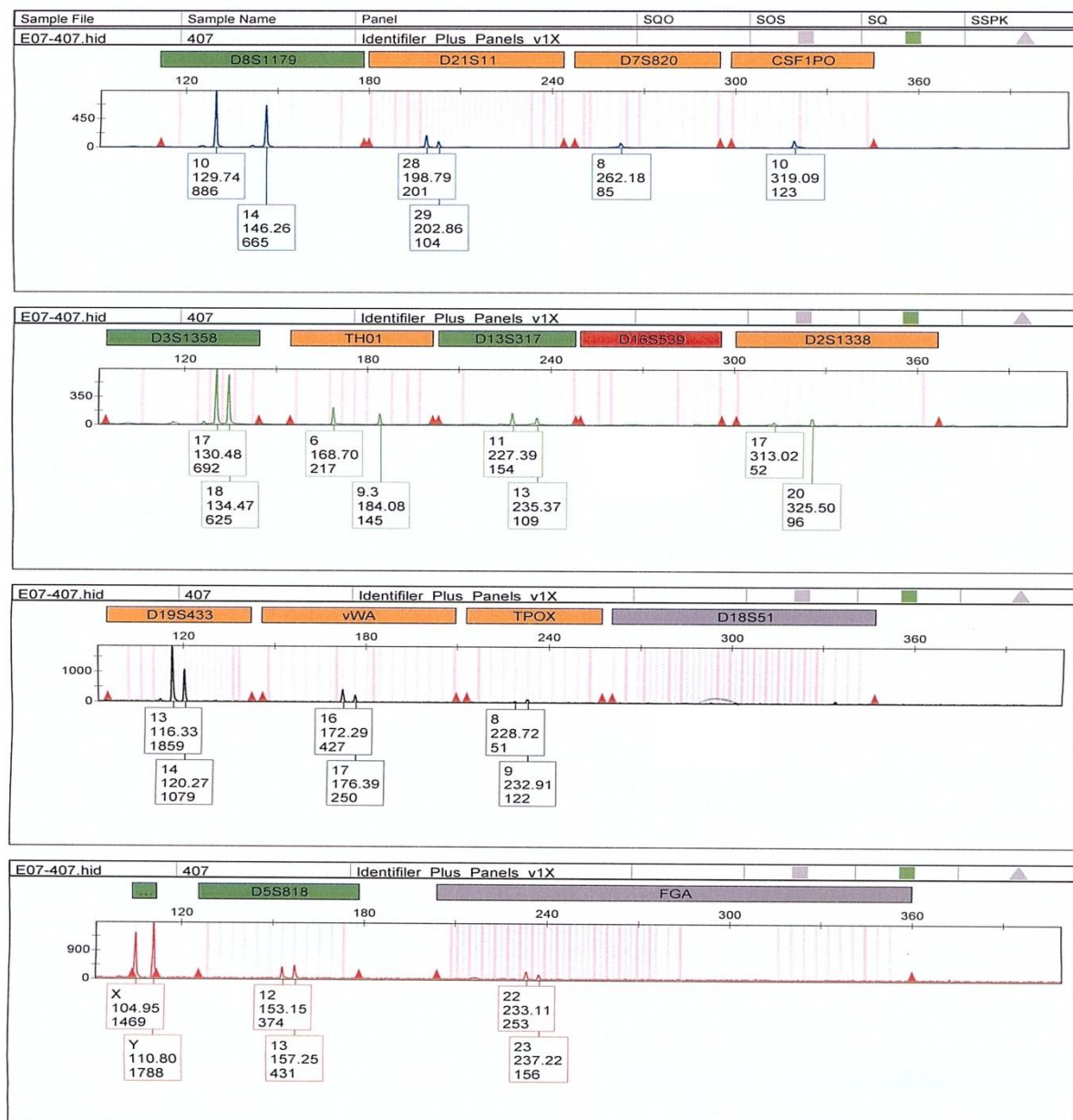


Figura 51. Perfil genético da amostra 407 extraída por *Chelex*, amplificada com 7µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

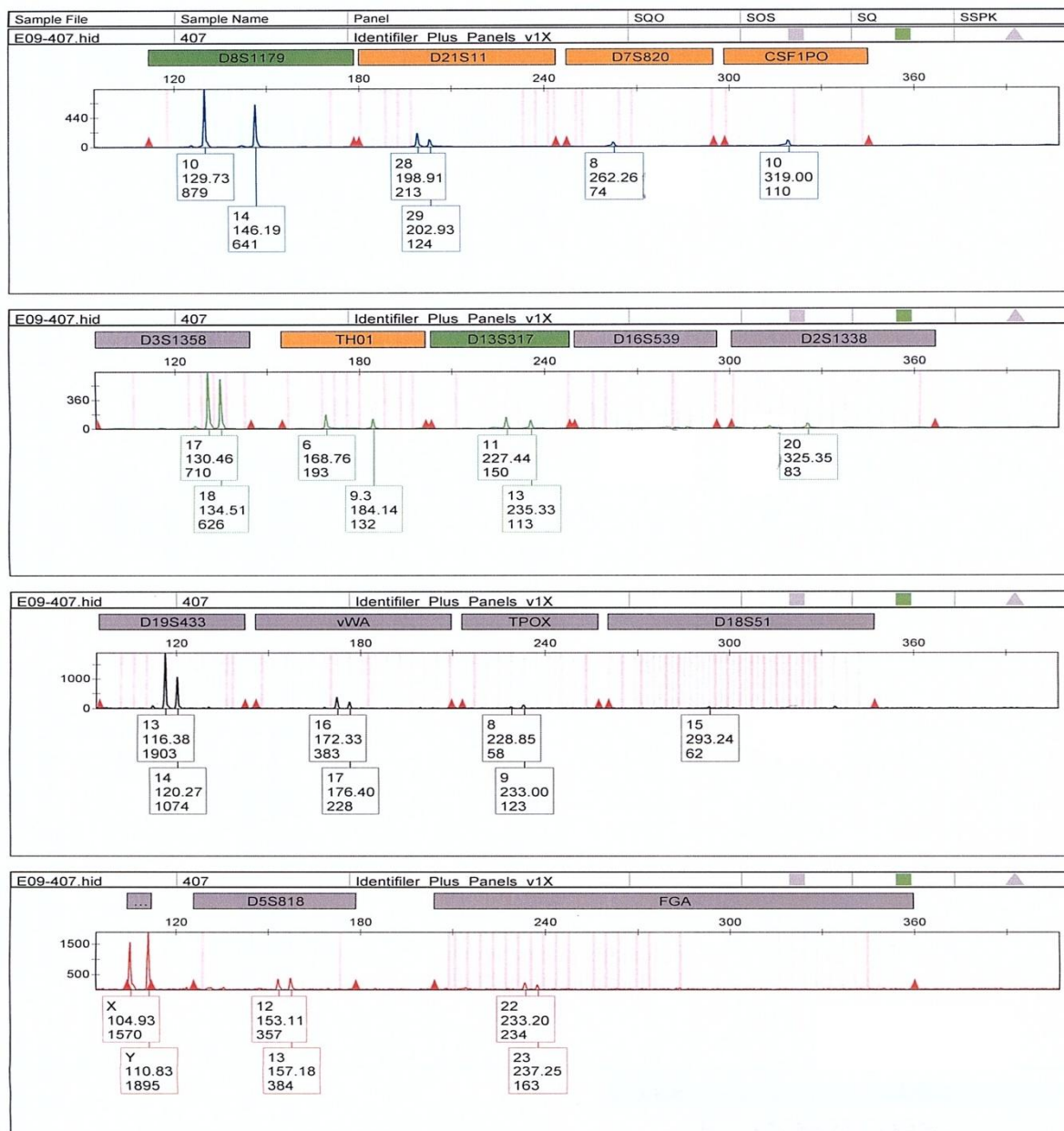


Figura 52. Perfil genético da amostra 407 extraída por *Chelex*, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifier™ Plus*

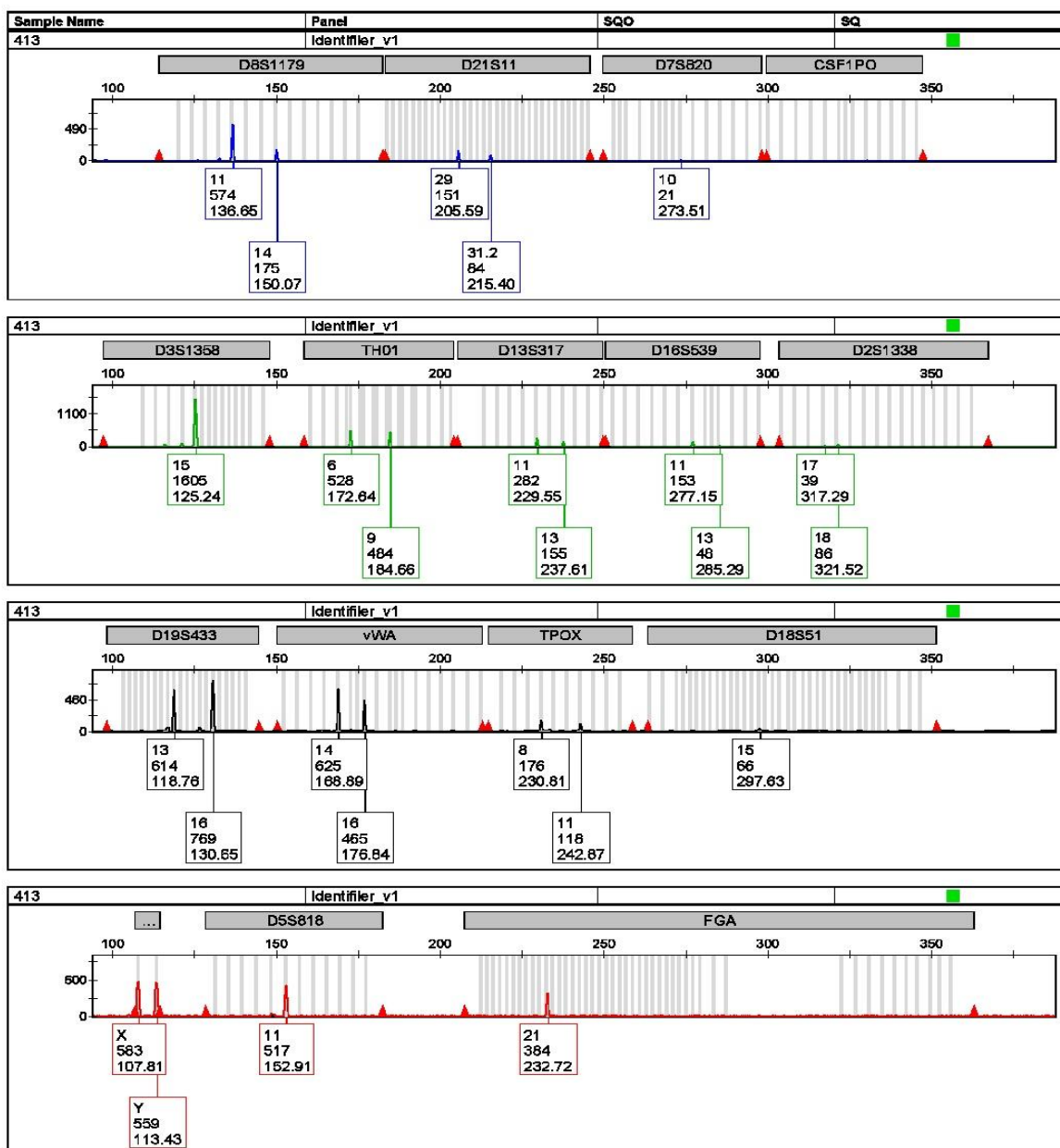


Figura 53. Perfil genético da amostra 413 extraída por *Chelex*, amplificada com 1µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™*

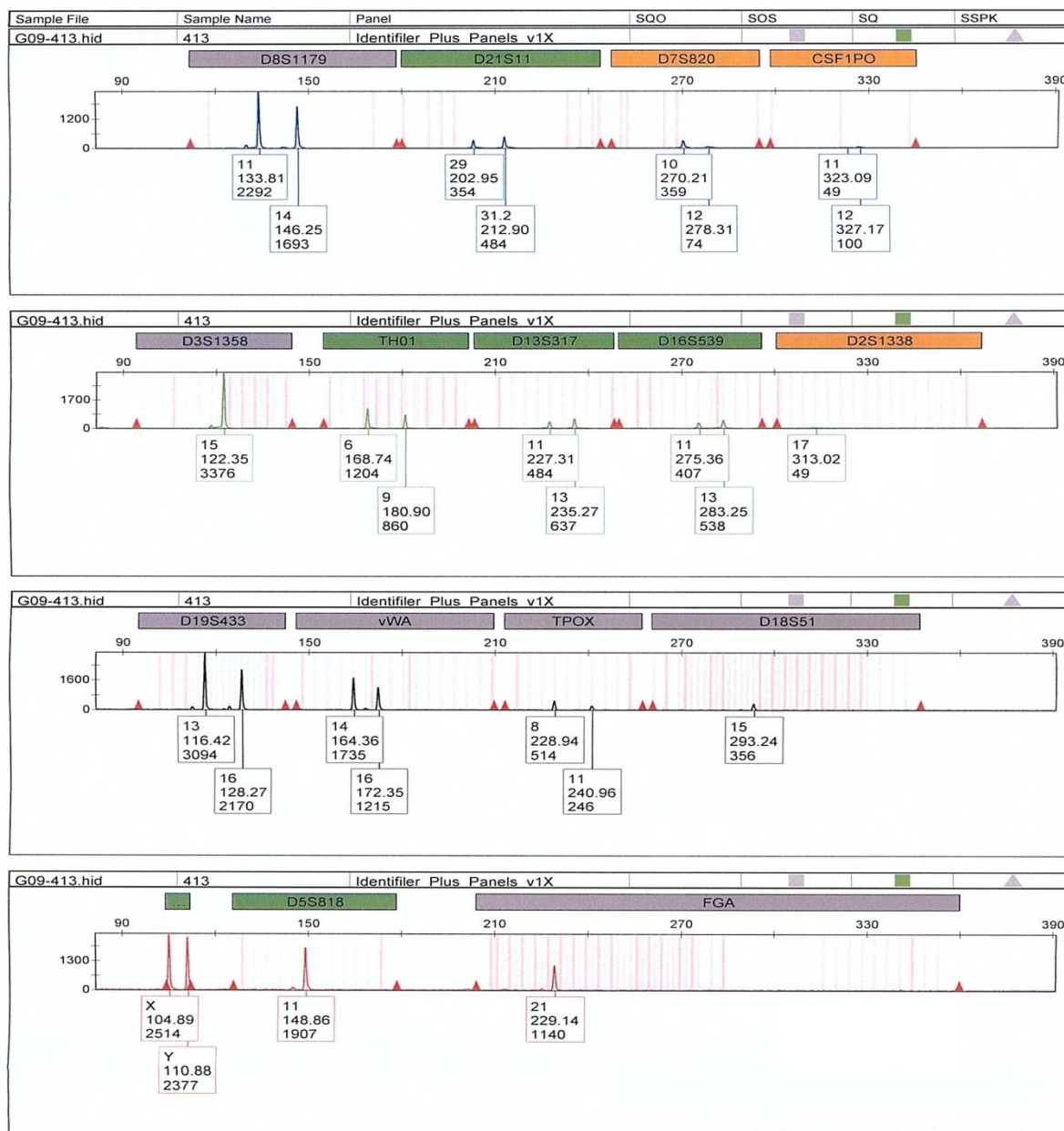


Figura 54. Perfil genético da amostra 413 extraída por *Chelex*, amplificada com 2µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

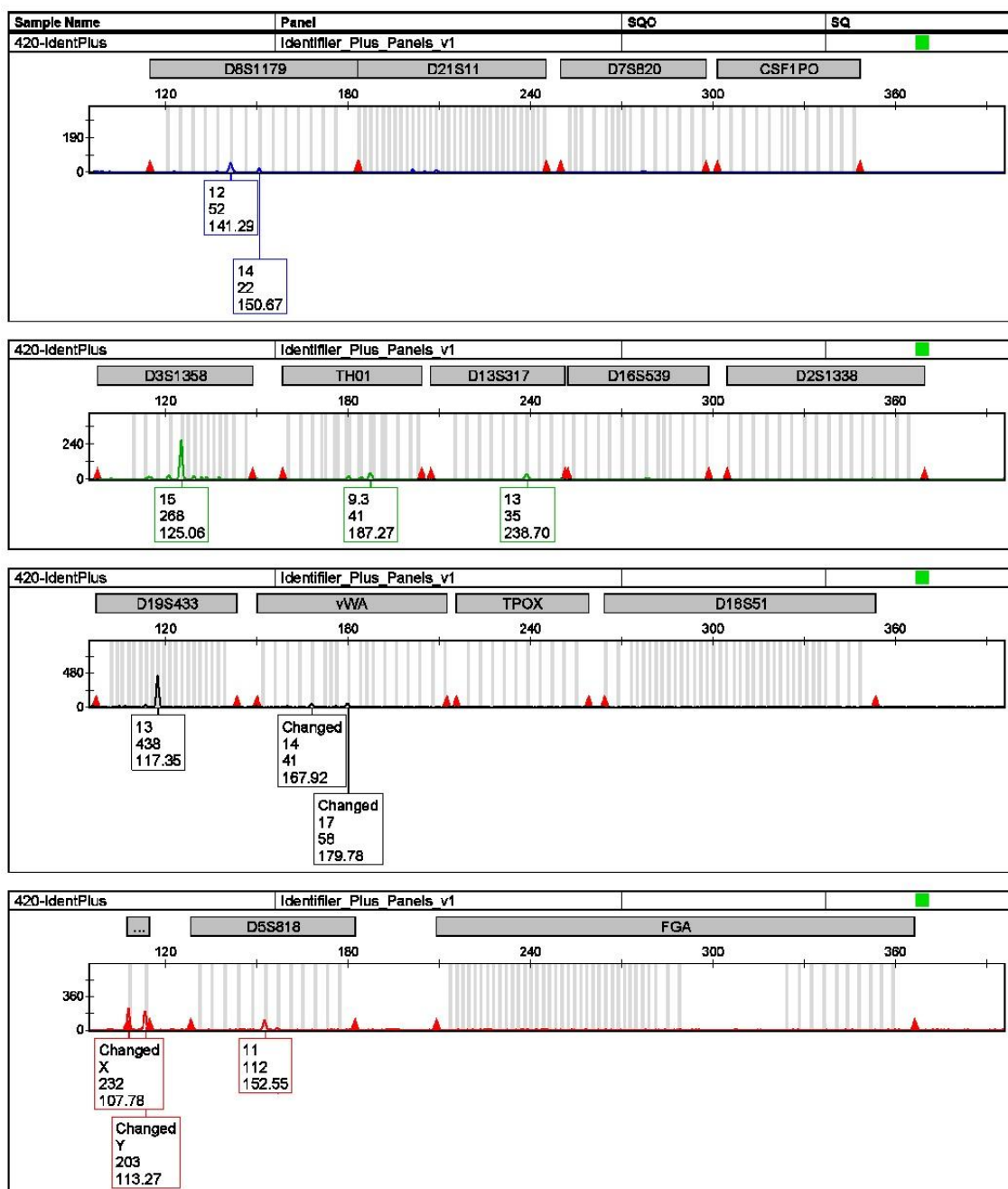


Figura 55. Perfil genético da amostra 420 extraída por *Chelex*, amplificada com 6µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus*

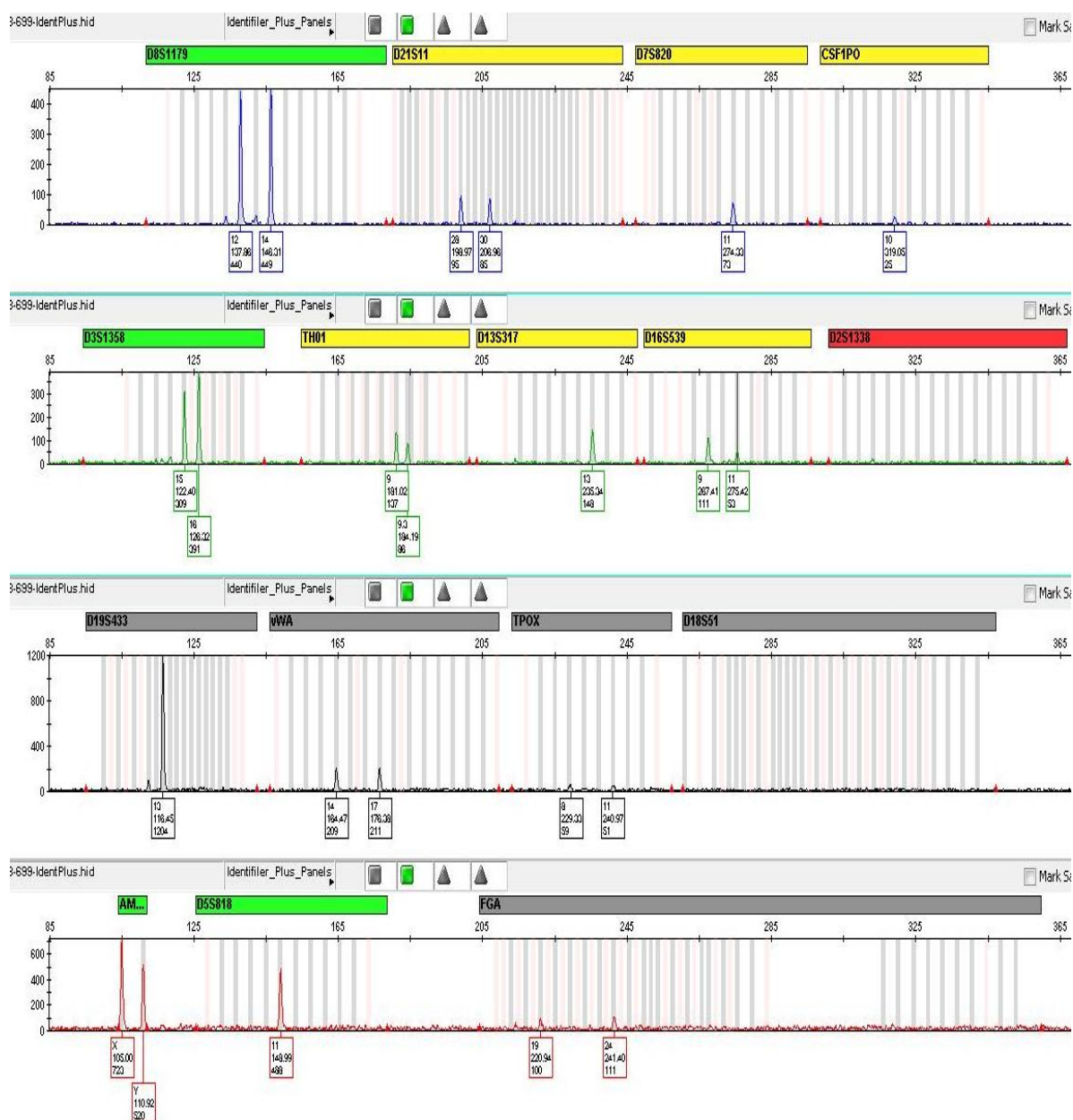


Figura 56. Perfil genético da amostra 699 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpF Φ STR[®] Identifiler[™] Plus*

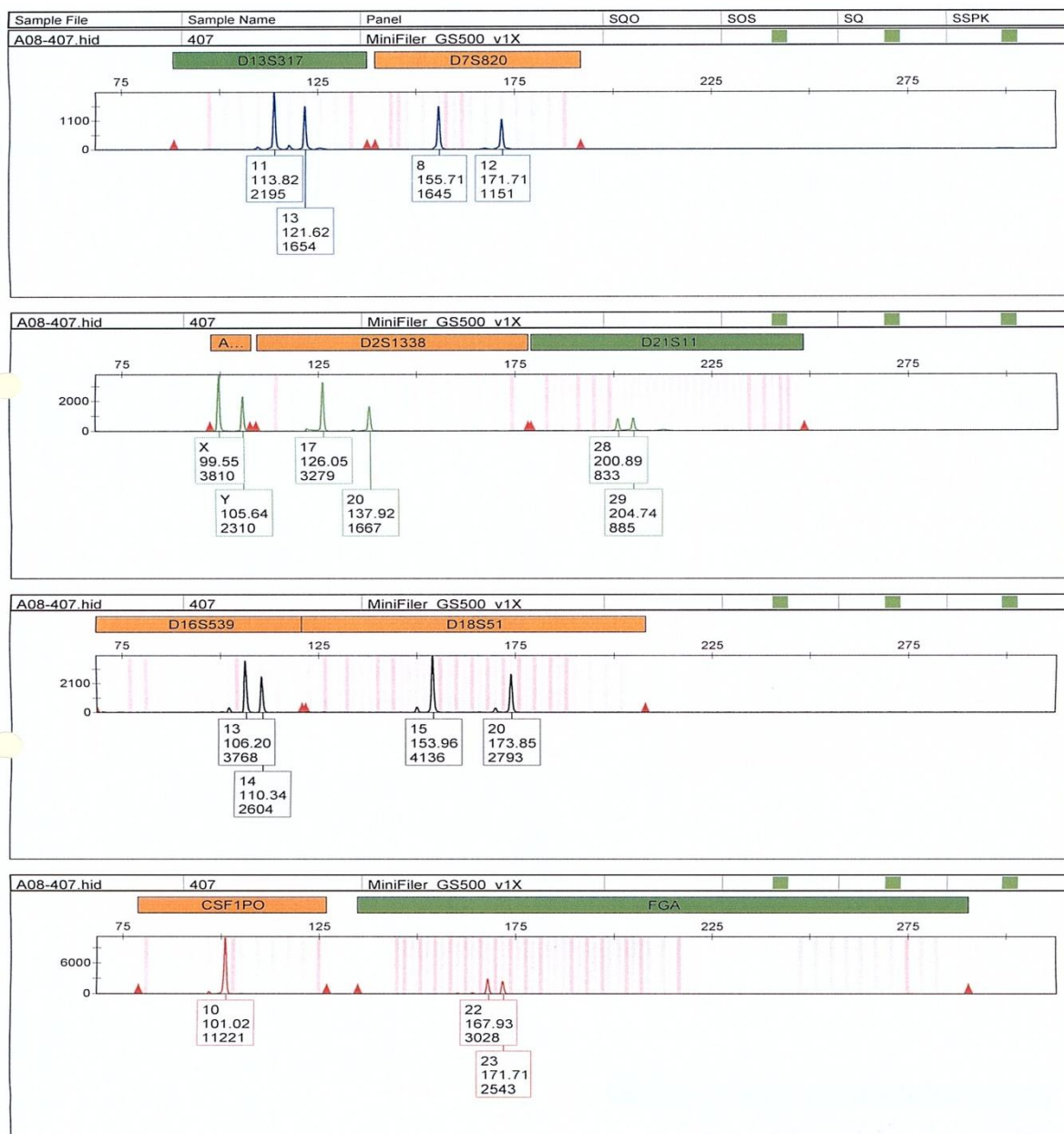


Figura 57. Perfil genético da amostra 407 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpF&STR*® *MiniFiler*™

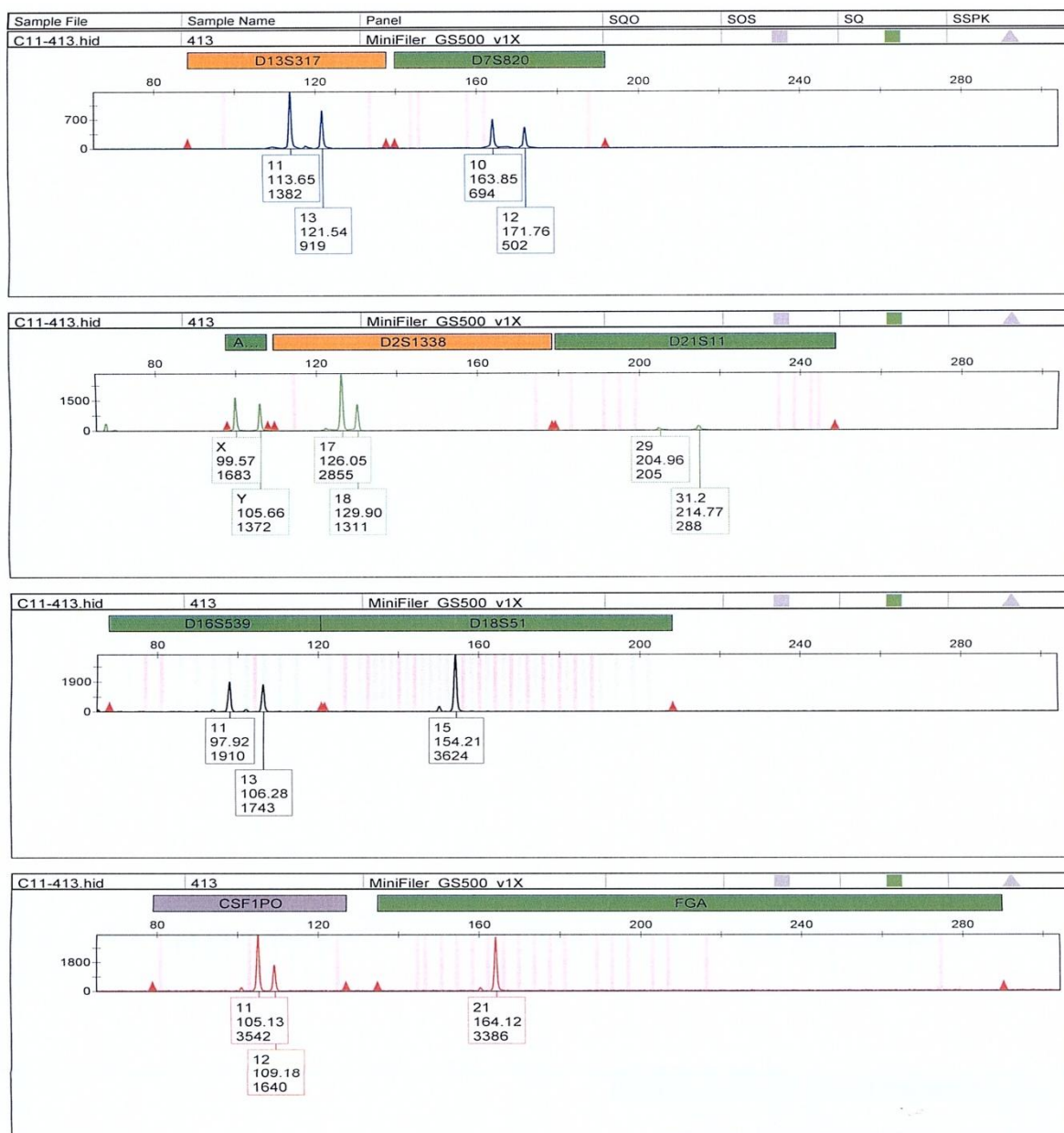


Figura 58. Perfil genético da amostra 413 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR®* *MiniFiler™*

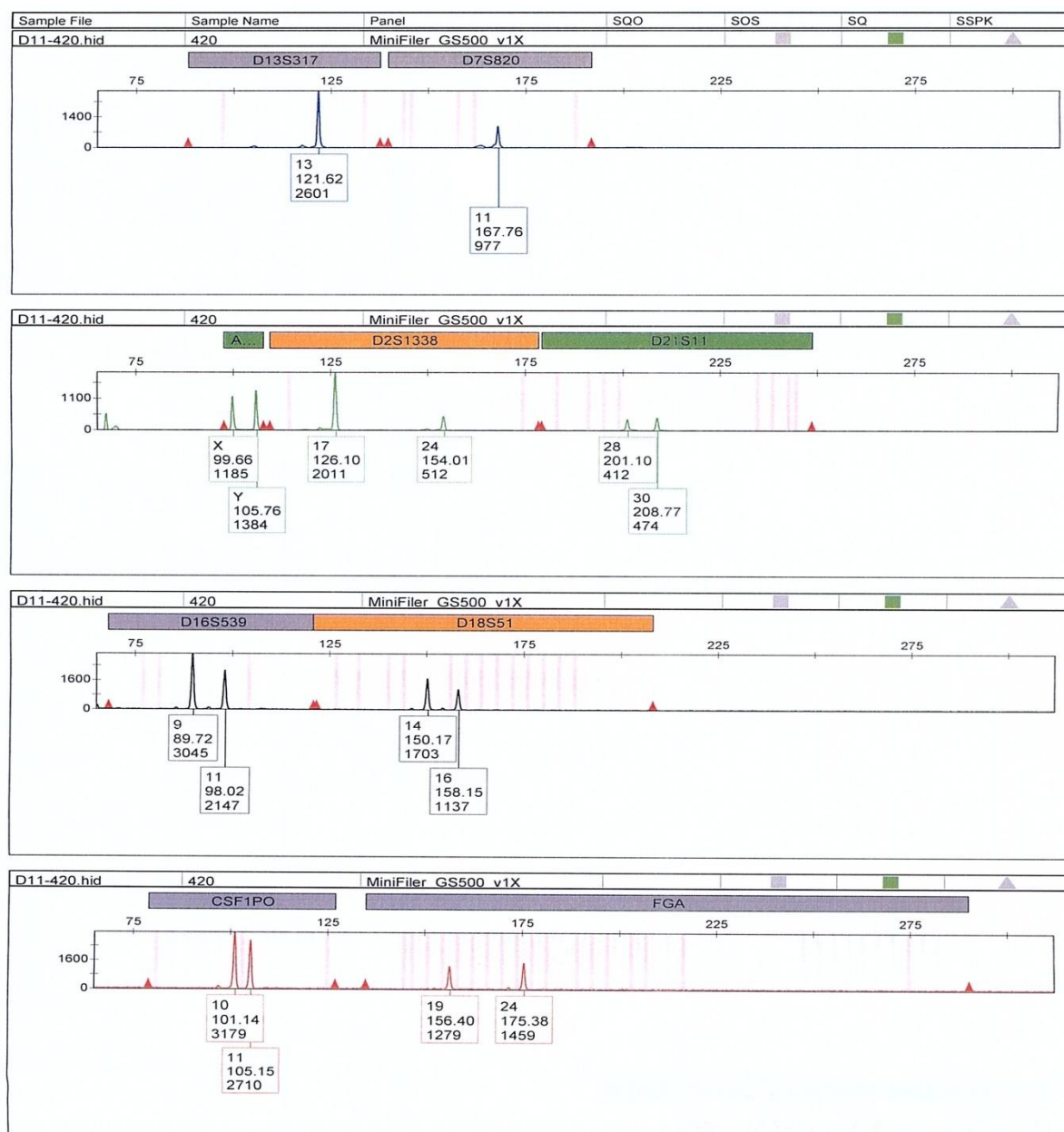


Figura 59. Perfil genético da amostra 420 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpF ℓ STR*® *MiniFiler*™

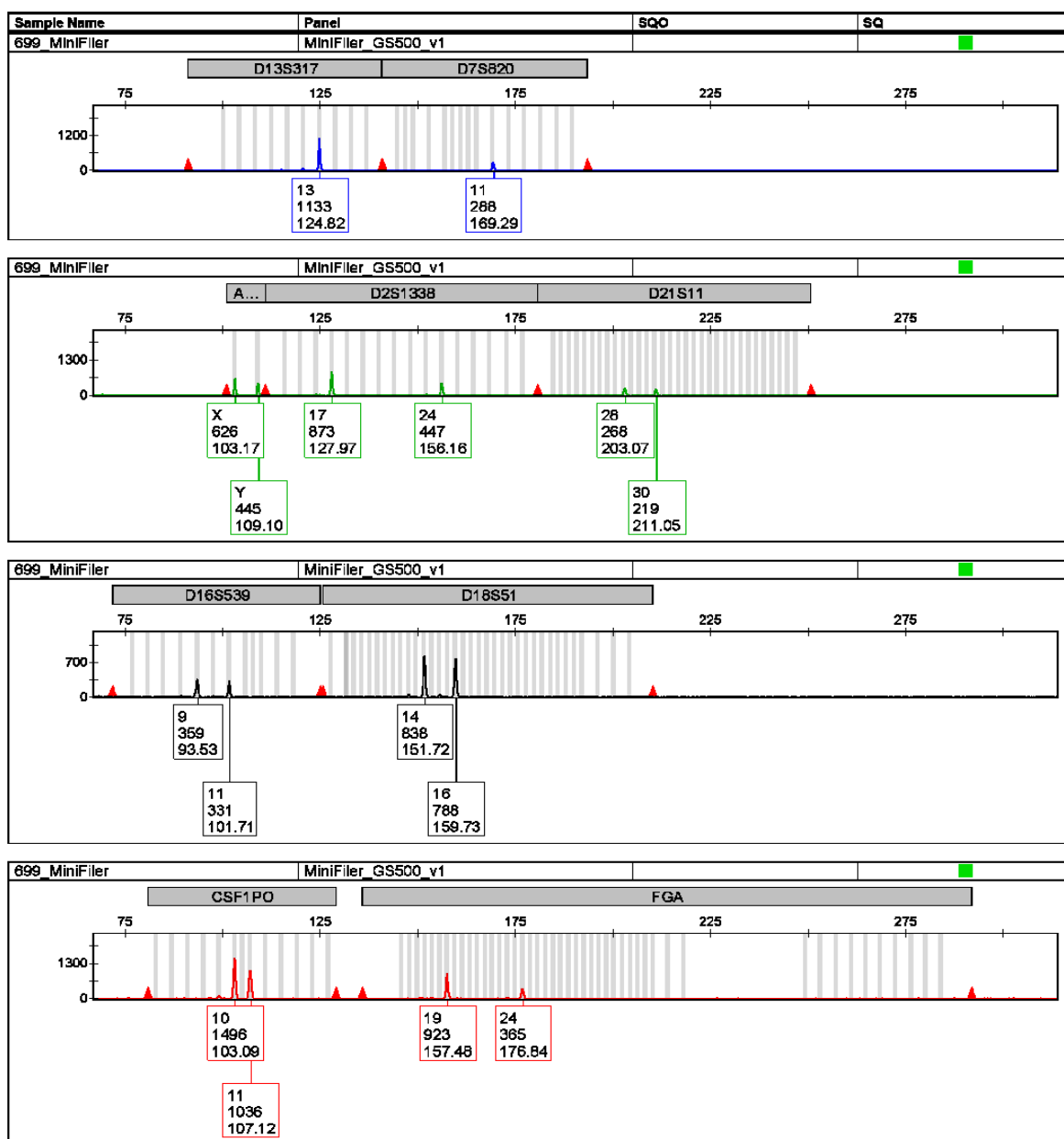


Figura 60. Perfil genético da amostra 699 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpFℓSTR®* *MiniFiler™*

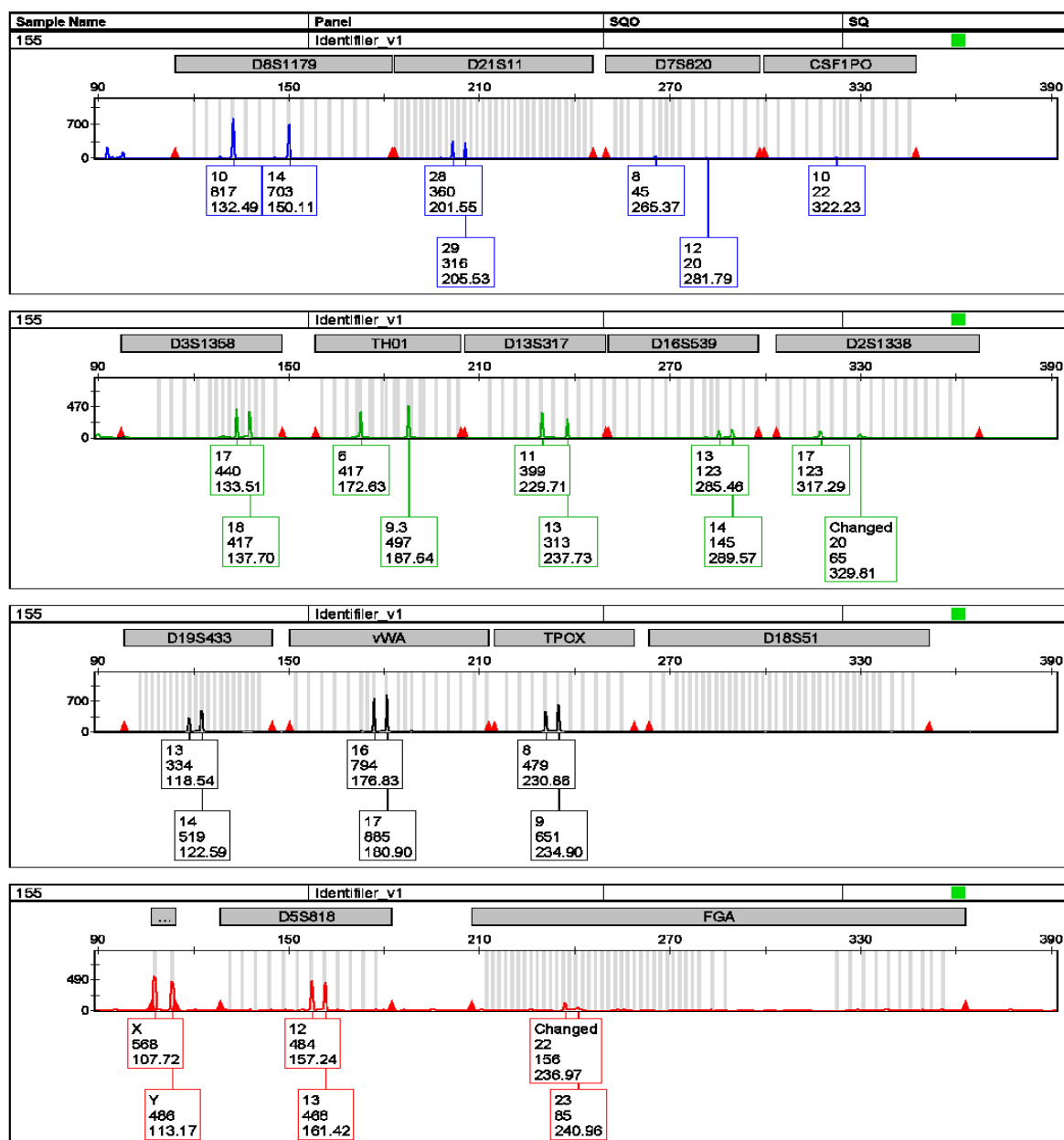


Figura 62. Perfil genético da amostra 155 extraída por *Chelex*, amplificada com 5µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™*

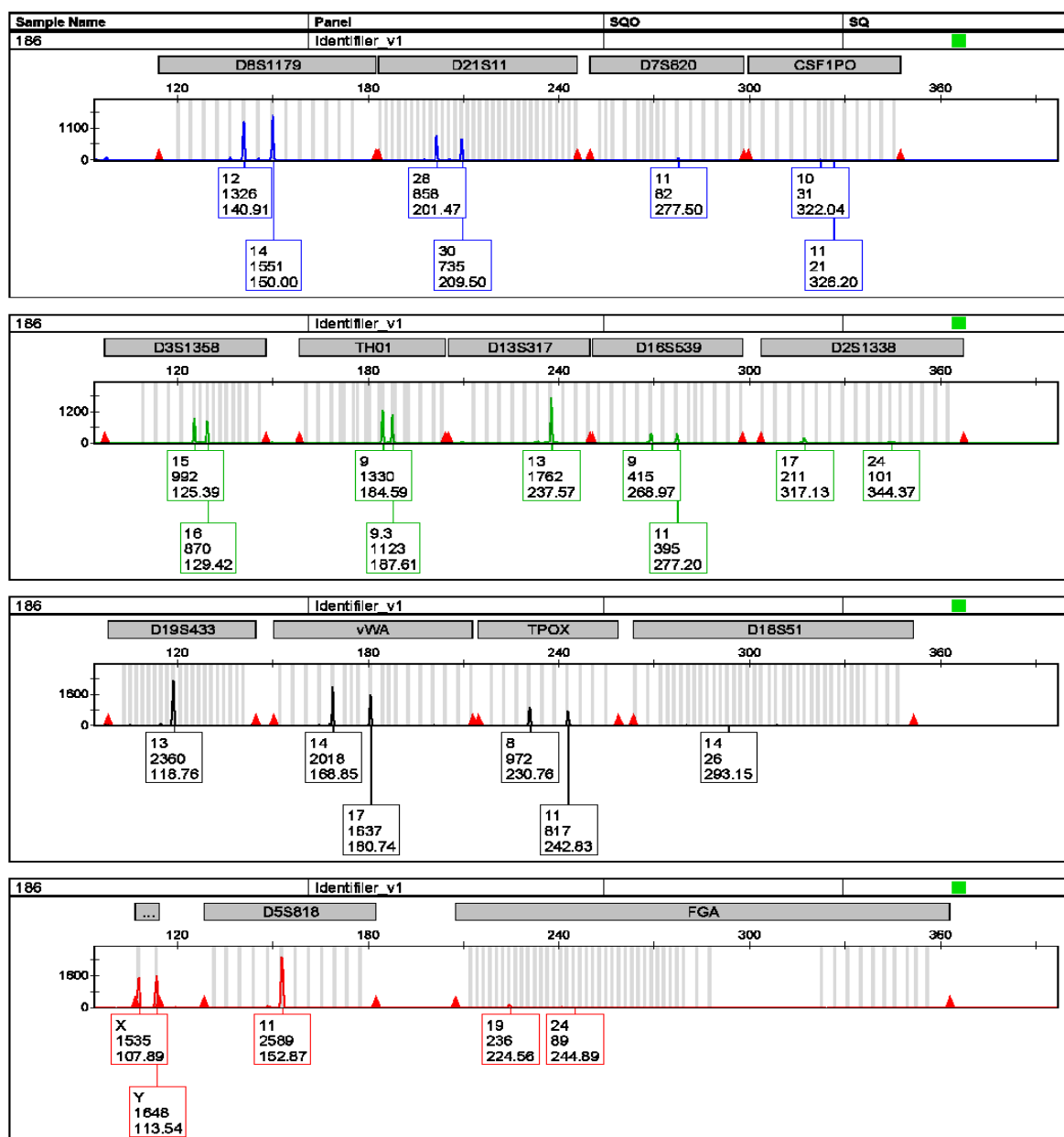


Figura 63. Perfil genético da amostra 186 extraída por *Chelex*, amplificada com 5µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifiler™*

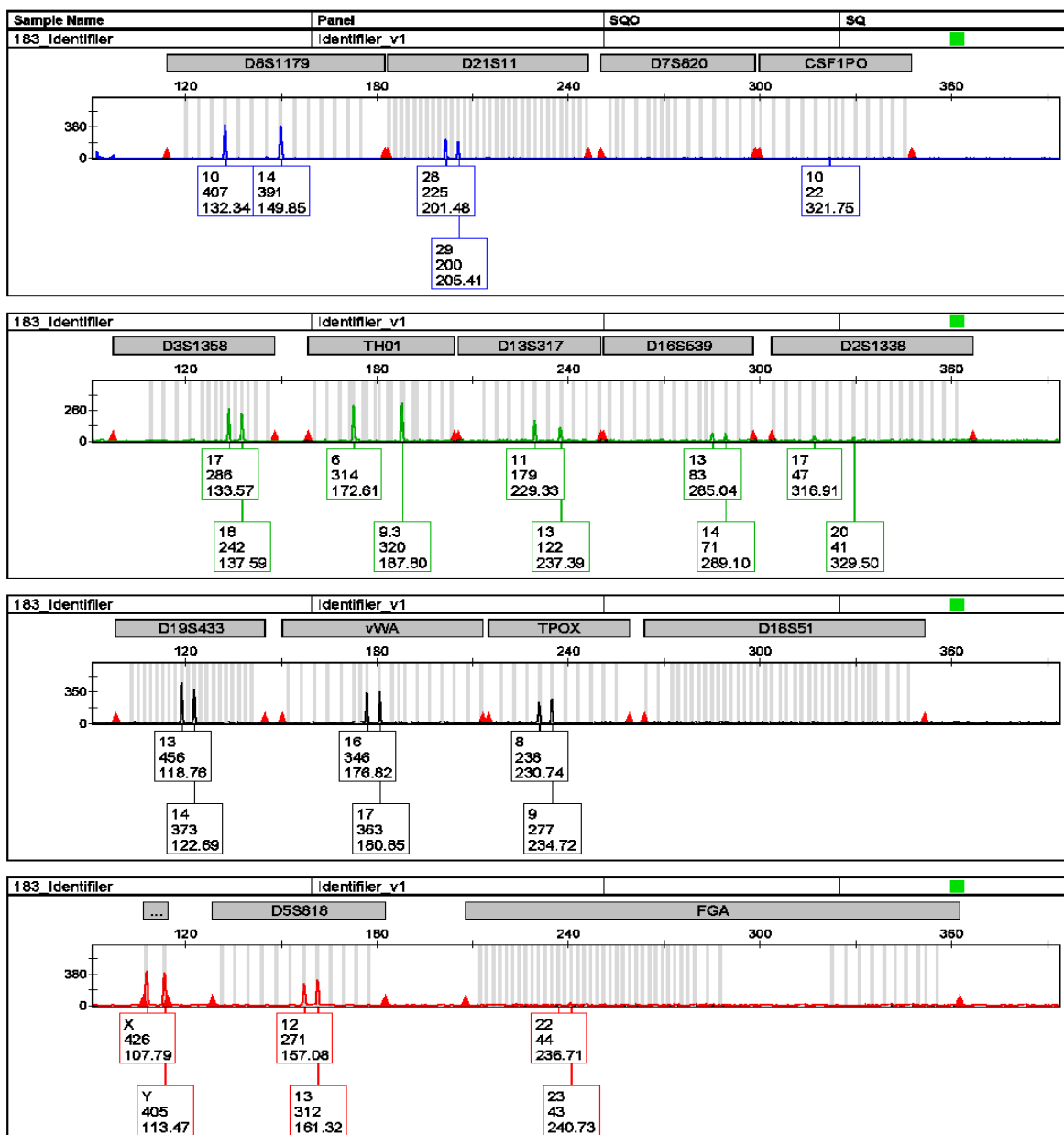


Figura 64. Perfil genético da amostra 183 extraída por *Chelex*, amplificada com 5µl de produto extraído com o kit *AmpFℓSTR® Identifier™*

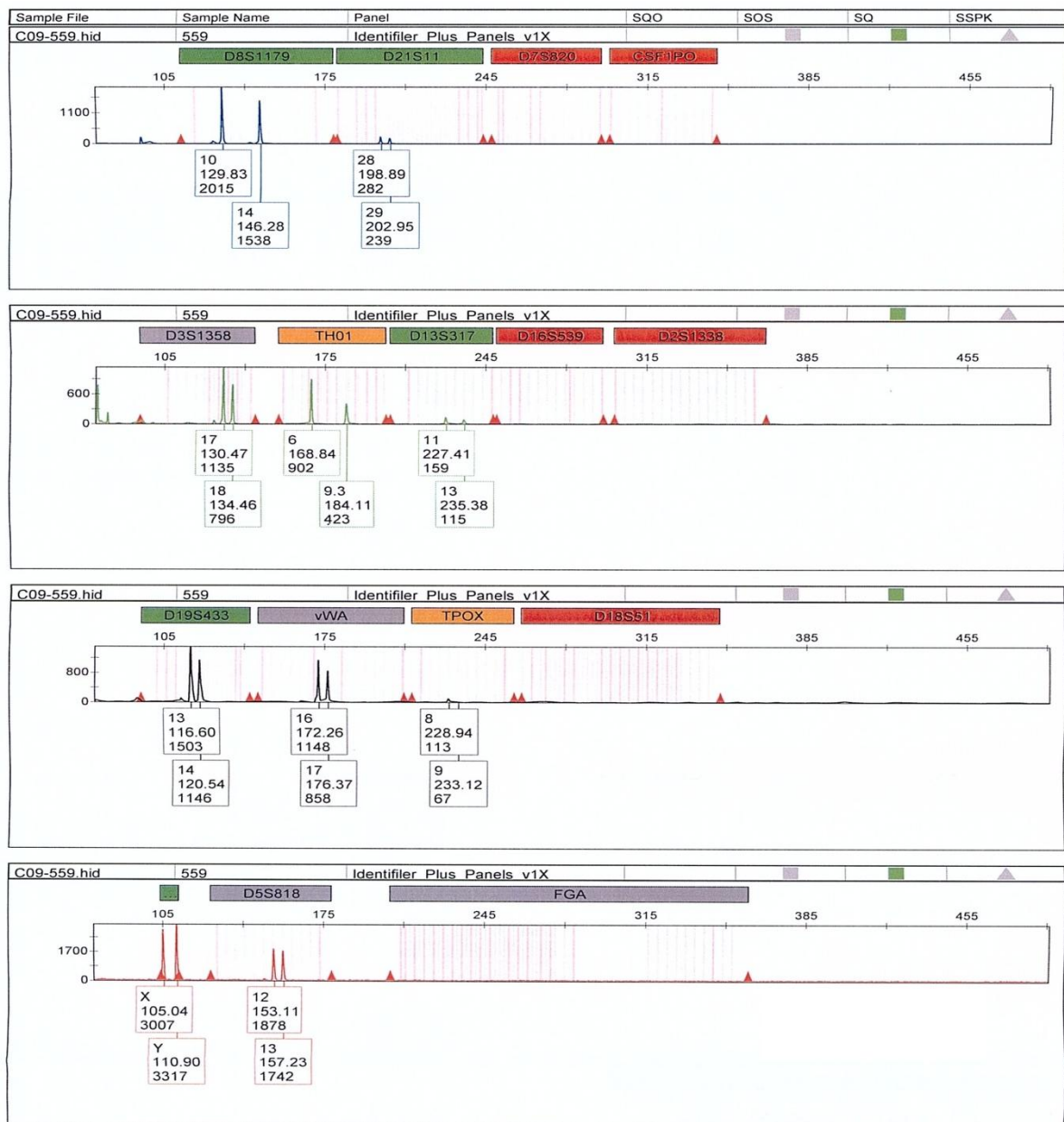


Figura 65. Perfil genético da amostra 559 extraída por DNA IQ System, amplificada com 10µl de produto extraído com o kit AmpFℓSTR® Identifiler™ Plus

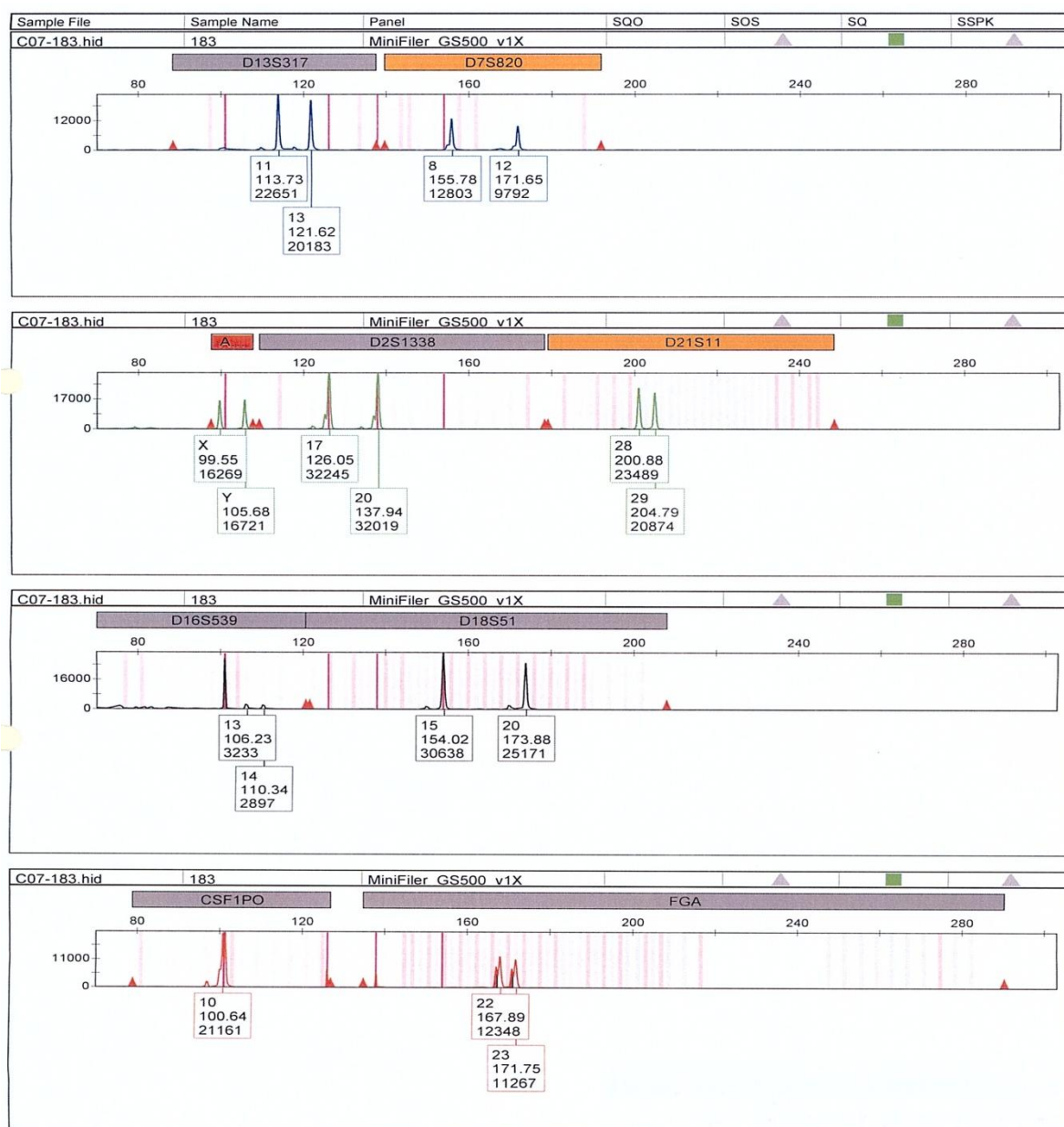


Figura 66. Perfil genético da amostra 183 extraída por *Chelex* e amplificada com o kit *AmpF Φ STR*[®] *MiniFiler*[™]

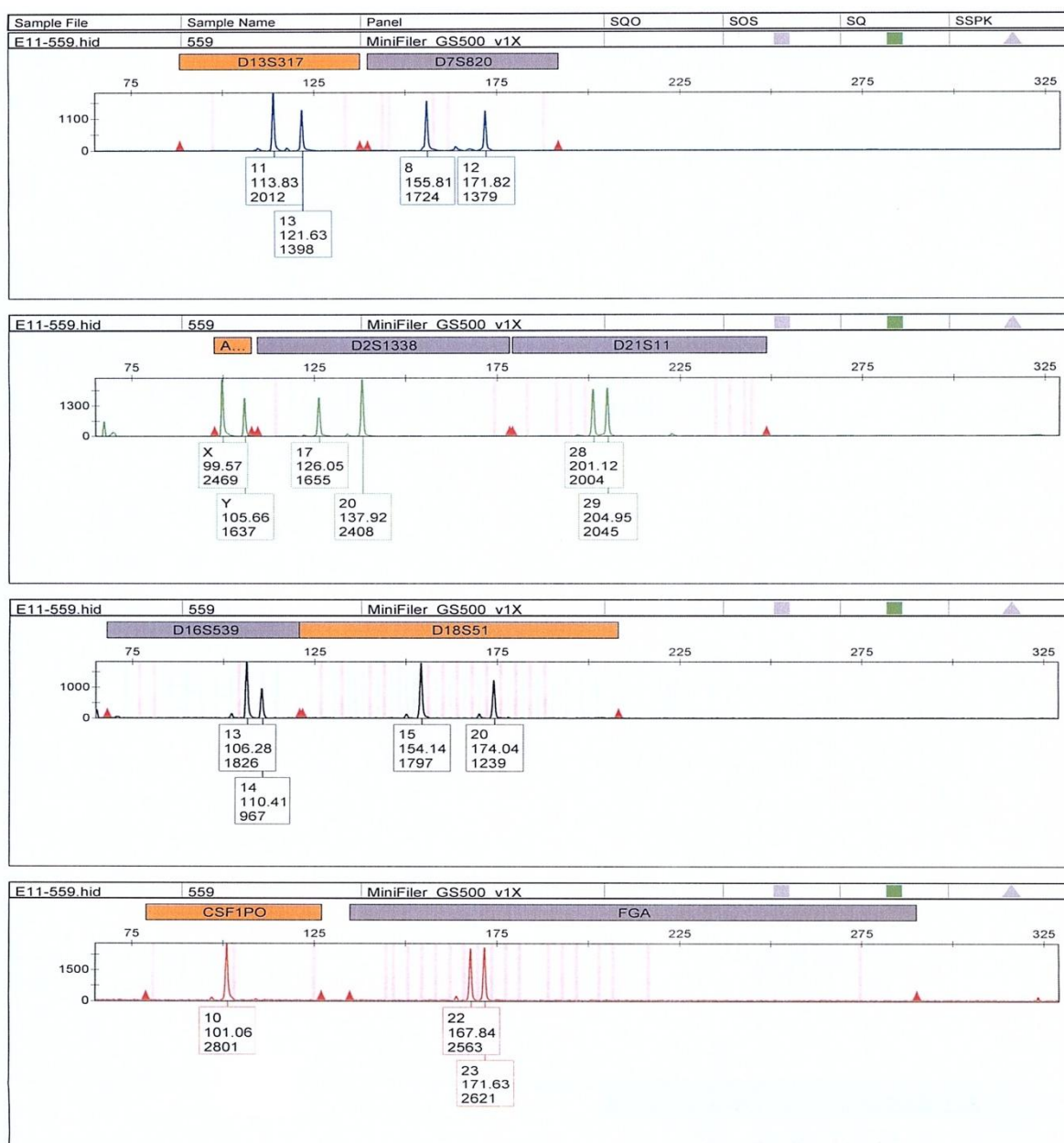


Figura 67. Perfil genético da amostra 559 extraída por DNA IQ System e amplificada com o kit AmpFℓSTR® MiniFiler™

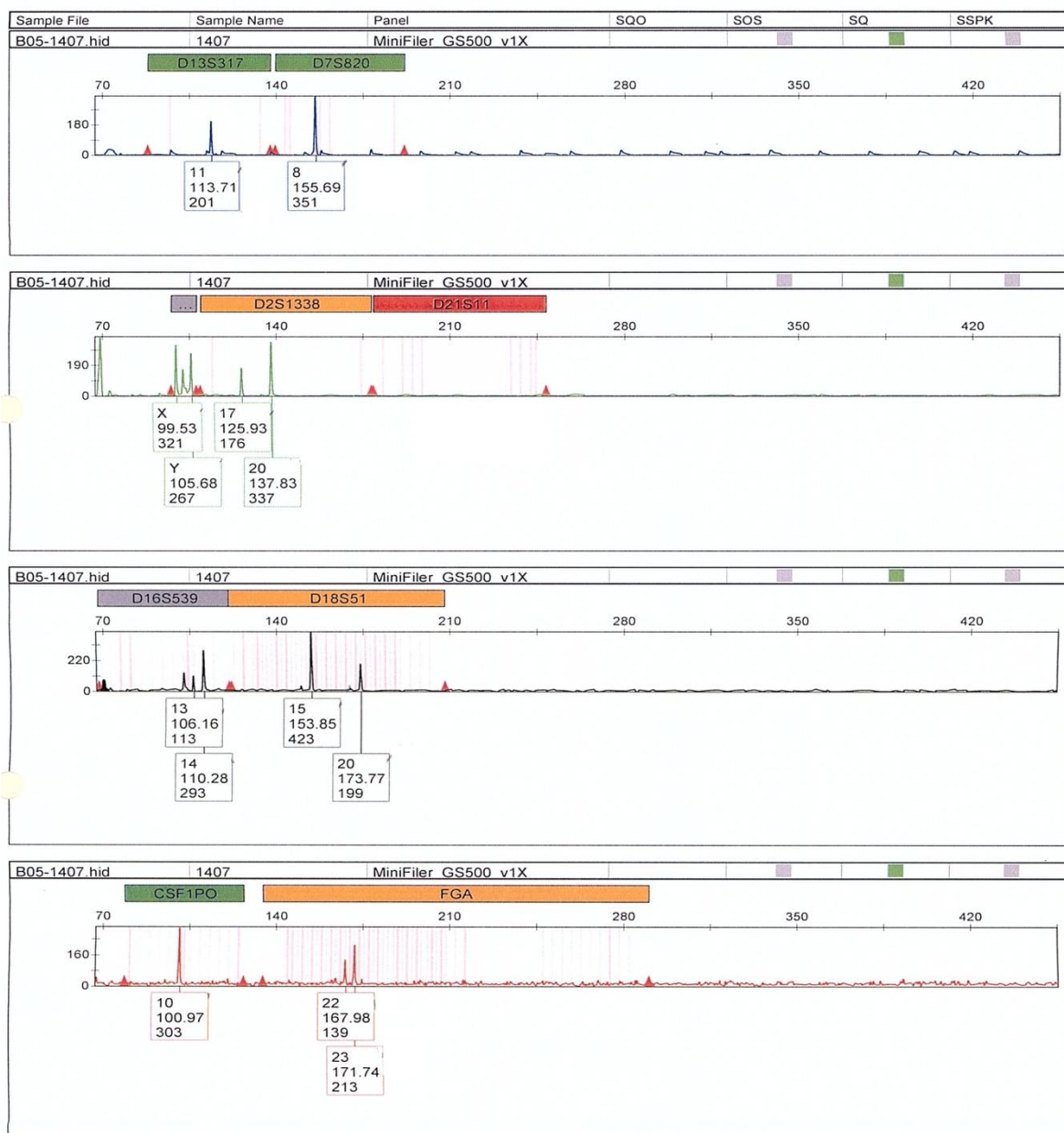


Figura 68. Perfil genético da amostra 1407 extraída com o *kit DNA IQ System* e amplificada com o *kit AmpFℓSTR® MiniFiler™*



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Research article

Genetic identification of degraded DNA samples buried in different types of soil

V. Bogas^{a,*}, M. Carvalho^a, M.J. Anjos^a, M.F. Pinheiro^{b,c,d}, F. Corte-Real^{a,e}^a Genetic Forensic Service of National Institute of Legal Medicine, Largo Sé Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal^b Genetic Forensic Service of National Institute of Legal Medicine, Jardim Carrilho Videira 4050-167 Porto, Portugal^c Health Sciences Faculty of University Fernando Pessoa, Rua Carlos Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal^d Biomedical Sciences Faculty "Abel Salazar", Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal^e University of Medicine Faculty of Coimbra, Rua Larga, 3000-504 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2009

Accepted 4 August 2009

Keywords:

Degraded DNA

Soil

DNA extraction

Inhibitors

ABSTRACT

Biological samples buried in different types of soil are often found in crime scenes. These samples are usually highly degraded which difficult their analysis. Several factors contribute to the degradation of biological material including temperature variation, humidity, UV light and especially the presence of microorganisms.

Blood was collected from three non-related male donors and blood stains were made in fabrics such as jeans, cotton and lycra. Blood stains were dried at room temperature and buried in three different types of soil (sand, marsh and clay), to promote its natural degradation.

The buried samples suffered a high degradation over time which difficult their genetic identification. The marshy soil proved to be the most destructive one, leading to rapid degradation of the different analyzed fabrics, which disabled the obtainment of the genetic profiles.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The cellular post-mortem degradation starts with the autolysis of the cell membrane. As a consequence the DNA is released to the environment and once in the soil it can (1) connect to minerals and humic substances such as humic acid (HA), (2) be degraded by bacterial DNases and used as nutrients for growth of plants and microorganisms or (3) be incorporated into the bacterial genome.

The preservation of DNA from buried samples is influenced by physical, chemical and biological properties of DNA and soil characteristics, such as pH, moisture percentage, concentration of humic substances, mineral content and cation concentration, and is dependent on its connection to certain minerals, humic substances and organomineral complexes.

The increase of humidity percentage leads to an increase in the number of microorganisms and consequently to a higher DNase activity. Another factor which affects the DNA degradation rate is temperature: whenever it rises, the half-life time of DNA decreases, as a consequence of increased activity of DNases [1,2].

2. Materials and methods

18 ml of blood was collected from three non-related male donors and 36 blood stains with approximately 7 cm of diameter were made in three different fabrics such as jeans, cotton and lycra, previously washed and decontaminated for 20 min with UV

light. Blood stains were dried during 3 days at room temperature before being buried in three different types of soil (sand, marsh and clay).

Small pieces of each stain (12.5 cm²) were collected after 15, 30 and 90 days. At this time, day, hour, place, presence of vegetation, temperature and humidity were registered. Photographic registration of the places and stains were also obtained, as well as, graphical registers from the closest meteorological stations, such as temperature, pressure, humidity and rainfall of the 31 days that preceded the collection. The different soils were also chemically characterized (Table 1).

Positive controls (blood stains of each individual) were made in all types of fabric. All samples, including the controls, were properly conditioned and frozen at –80 °C until its analysis.

DNA extraction was performed using Chelex 100 [3], QIAmp Investigator kit (Qiagen) and DNA IQ™ System kit (Promega). Samples extracted with Chelex were also purified and concentrated with Microcon-100® Centrifugal Filter Units and NaOH [4]. DNA was quantified with Quantifiler™ Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems) and BSA (bovine serum albumin), according to manufacturer's instructions using an ABI Prism® 7000 (real-time PCR). Samples were amplified with AmpF/STR® I-® Identifiler™ and AmpF/STR® MiniFiler™ kits and analyzed in an ABI Prism® 3130 Analyzer.

3. Results

After 90 days, jeans and cotton fabrics buried in marshy soil disappeared. Since only lycra remained in this type of soil for so

* Corresponding author. Tel.: +351 239854230; fax: +351 239826132.
E-mail address: geneforensedcinmlmj.pt (V. Bogas).

Table 1

Chemical characterization of the different soils.

Samples	SiO ₂ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	CaO (%)	MgO (%)	Na ₂ O (%)	K ₂ O (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	P ₂ O ₅ (%)	TiO ₃ (%)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	pH
Marshy soil	55.14	17.56	4.12	2.57	1.07	1.63	3.53	0.65	0.80	978	27.1	160	5.91
Sandy soil	68.32	8.66	7.51	1.05	0.89	1.12	1.24	0.09	1.23	234	12.6	71	6.84
Clay soil	54.63	20.31	2.13	1.54	0.84	1.72	4.96	0.56	0.78	563	32.1	97	5.80

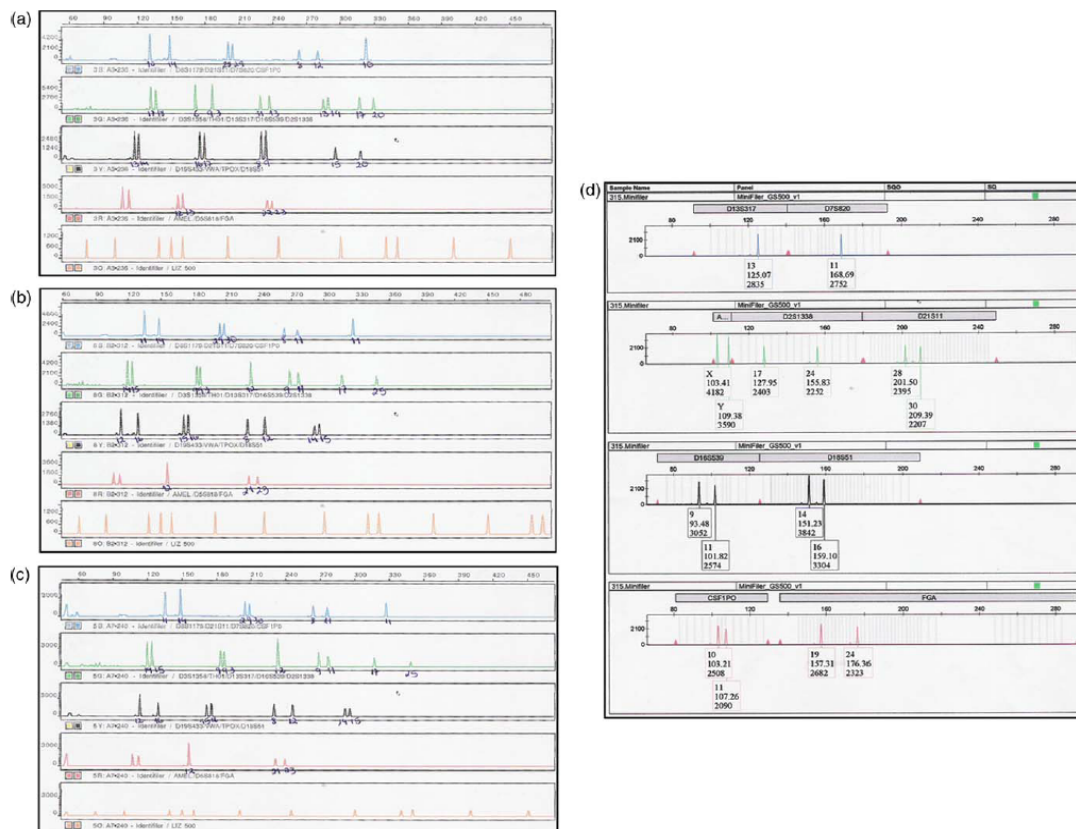


Fig. 1. (a) Genetic profile of N Denim 15 days (Identifiler), (b) genetic profile of A Lycra 15 days (Identifiler), (c) genetic profile of A Lycra 30 days (Identifiler), (d) genetic profile of P Lycra 30 days (Minifiler).

long, it seems that this is a highly resistant fabric. Despite of its resistance, their DNA profiles were not able to be obtained, as a result of the extremely degraded DNA.

In spite of the fabrics buried in the other types of soil did not disappear after 90 days, quantification results after 15, 30 and 90 days, showed a high DNA degradation rate over time.

The best DNA profiles were obtained with samples buried during 15 and 30 days in sandy soil, extracted with QIAmp Investigator kit (Fig. 1a–d).

4. Discussion

DNA samples, when buried in these types of soil, suffer a high degradation overtime which difficult their analysis. The most aggressive soil was the marshy one, leading to rapid degradation of

the different analyzed fabrics, probably because of its high proportion of moisture and microbial proliferation, verified after 15 days, disabling the obtainment of genetic profiles. The sandy soil with the highest pH showed the lowest degradation rate which allowed to achieve complete DNA profiles.

5. Conclusion

It is important to focus that between Chelex 100, DNA IQ system kit and QIAmp Investigator kit extraction methods, this last one allowed obtaining the best DNA profiles.

It is essential to continue seeking for new methods of DNA extraction and purification as well as to improve the existing ones, in order to recover even the smallest amount of DNA present in degraded samples enabling their genetic identification.

Conflict of interest

None.

References

- [1] D. Levy-Booth, R. Campbell, R. Gulden, M. Hart, J. Powell, J. Klironomos, K. Pauls, J. Swanton Clarence, J. Trevors, K. Dunfield, Cycling of extracellular DNA in the soil environment, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 2977–2991.

- [2] S.A.E. Blum, M.G. Lorenz, W. Wackernagel, Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils, *Syst. Appl. Microbiol.* 20 (1997) 513–521.
- [3] P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi, Chelex 100 as a medium for a simple extraction of DNA for PCR-based typing from a forensic material, *Biotechniques* 10 (1991) 506–513.
- [4] M. Bourke, C. Scherzinger, C. Ladd, H. Lee, NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase, *J. Forensic Sci.* 44 (5) (1999) 1046–1050.



Comparison of four DNA extraction methods for forensic application

V. Bogas^{a,*}, F. Balsa^{a,b}, M. Carvalho^{a,b}, M.J. Anjos^{a,b}, M.F. Pinheiro^{b,c,d,e}, F. Corte-Real^{b,f,g}

^a Forensic Genetic Service, Centre Branch, National Institute of Legal Medicine, IP, Coimbra, Portugal

^b CENQFOR, Forensic Sciences Centre, Portugal

^c Forensic Genetic Service, North Branch, National Institute of Legal Medicine, IP, Porto, Portugal

^d Faculty of Health Sciences of University Fernando Pessoa, Porto, Portugal

^e Faculty of Biomedical Sciences "Abel Salazar", Porto, Portugal

^f Centre Branch of National Institute of Legal Medicine, Coimbra, Portugal

^g Medicine Faculty of the University of Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2011

Accepted 29 August 2011

Keywords:

DNA extraction

Degraded DNA

ABSTRACT

Challenging biological samples found in crime scenes are often brought to our lab. Several factors, such as degradation and the presence of inhibitors, can difficult the analysis of these samples. Chelating resin, silica membranes, silica-coated magnetic beads and paramagnetic resin were DNA extraction techniques used in this study. Our aim was to find out the DNA extraction method more suitable to overcome problems raised by these samples and to enable the identification of its genetic profile.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The forensic investigators often have to deal with *post mortem* samples collected from crime scenarios, which were subjected to environmental conditions that cause its degradation and turned its study difficult. Biological samples buried in different type of soils are often found in crime scenes. These challenging samples contain minute amounts of DNA with the presence of different inhibitors which difficult the extraction and amplification process and the consequent achievement of its genetic profile [1]. The procedures used in the isolation and extraction of the DNA vary with the type of biological sample and the type of support where it is deposited. An optimal procedure of DNA extraction should be non-toxic, fast and economic and should enable to recover high purified DNA from each sample. However, there is no "universal" DNA extraction procedure, which fulfils all these requirements. In recent years various commercial kits for extraction of forensic DNA samples have been developed.

2. Materials and methods

Blood was collected from three non related donors and 60 blood stains with approximately 7 cm of diameter were made in three different fabrics such as denim, cotton and lycra, previously

washed and decontaminated for 20 min with UV light. Blood stains were dried during 3 days at room temperature before being placed in different degradation places, like indoors and buried in different type of soils (sand, marsh and clay). Small pieces of each stain were collected after 1, 3 and 7 days.

Positive controls (blood stains of each individual) were made in all type of fabrics. DNA extraction was performed using Chelex 100 method [2], QIAamp[®] DNA Investigator Kit (Qiagen), DNA IQ[™] System Kit (Promega) and with AutoMate Express[™] Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems). The samples which were buried in different types of soil and extracted with Chelex were also purified and concentrated with Microcon-100[®] and NaOH [3]. DNA was quantified adding 0.5 µl of BSA (Bovine Serum Albumin) [0.3%] to Quantifiler[™] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions using an ABI Prism[®] 7000 (real-time PCR). Samples were amplified with AmpF/STR[®] Identifiler[™] (Applied Biosystems), AmpF/STR[®] Mini-Filer[™] (Applied Biosystems), PowerPlex[®] ES17 System (Promega) and/or AmpF/STR[®] NGM[™] Kits and analyzed in ABI Prism[®] 3130 and ABI Prism[®] 3500 Analyzers.

3. Results

After seven days, the quantification results for the samples buried in marshy and clay soils showed that these were the most degraded samples. The quantification results for the samples buried in these soils and extracted with Chelex, DNA IQ System and QIAamp DNA Investigator methods were undetermined or had very low values, comparing to the quantification results obtained

* Corresponding author at: Centre Branch of National Institute of Legal Medicine, Largo da Sé Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal. Tel.: +351 239854230; fax: +351 239826132.

E-mail addresses: vanessa.bogas@dcinml.mj.pt, asvev@yahoo.com (V. Bogas).

Table 1

Quantification results of the different samples extracted with four DNA extraction methods. IPC values: und – undetermined; – normal (<30).

Sample	Support	Degradation days	Degradation local	DNAIQ		Prepfilier express		Chelex		QIAamp investigator	
				Amount of DNA (ng/μl)	IPC	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	Amount of DNA (ng/μl)	IPC
1	Denim	1 day	Indoor	0.4063	30.28	10.1860	27.19	0.1562	30.06	1.6464	28.69
2	Cotton	1 day	Indoor	1.2349	29.72	2.1365	27.37	0.1368	30.19	1.5714	28.16
3	Lycra	3 days	Indoor	0.4358	29.81	1.9608	27.56	0.2798	28.83	3.5821	27.99
4	Lycra	1 day	Marsh	und	31.13	0.0908	27.94	und	30.28	0.0105	29.94
5	Cotton	1 day	Marsh	und	31.04	0.0041	27.68	und	30.17	0.0246	29.64
6	Cotton	1 day	Marsh	und	30.63	0.0382	28.50	und	31.56	0.0261	29.84
7	Denim	1 day	Marsh	0.0005	30.17	5.1710	27.06	und	30.22	0.0147	29.64
8	Denim	3 days	Marsh	und	30.78	0.0015	32.41	0.0011	29.79	und	31.4
9	Cotton	3 days	Marsh	0.0087	30.36	0.0077	35.74	0.0025	29.88	und	29.73
10	Denim	3 days	Marsh	0.0020	30.17	0.0127	29.48	0.0038	29.75	und	29.49
11	Lycra	7 days	Marsh	0.0023	30.23	0.0030	37.42	0.0041	30.43	und	30.26
12	Cotton	7 days	Marsh	und	29.91	0.0121	28.38	und	31.35	und	30.49
13	Lycra	7 days	Marsh	0.0088	30.43	0.0062	30.81	0.0025	30.23	0.0135	29.94
14	Denim	1 day	Sand	4.9652	30.68	2.7877	27.13	2.4475	31.32	16.3100	31.79
15	Denim	1 day	Sand	1.2839	30.23	0.9058	27.59	0.9408	31.14	3.0903	30.14
16	Cotton	1 day	Clay	0.2569	29.44	1.3327	27.42	0.0305	30.26	0.1782	30.31
17	Denim	1 day	Clay	0.0025	29.69	0.1701	28.12	0.005	29.72	7.0445	31.42
18	Lycra	1 day	Clay	0.0042	29.46	1.3876	28.13	0.0021	29.17	0.1227	30.37
19	Lycra	7 days	Clay	0.0004	29.04	und	27.88	und	29.06	0.0060	29.94
20	Cotton	7 days	Clay	und	29.88	0.0014	28.27	0.0035	28.96	0.0194	28.96

with the same samples extracted with AutoMate Express™ robot (Table 1).

The AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System was more efficient in removing PCR inhibitors (IPC values are generally lower than IPC values of the other methods) leading to the recovery of higher DNA quality and consequently generated the best genetic profiles.

4. Discussion and conclusion

Quantification results, revealed that the samples buried in marshy and clay soils where the samples with the highest degradation.

Comparing the different DNA extraction methods, the samples extracted with Chelex and DNAIQ System showed the lowest quantification results, while QIAamp DNA Investigator and AutoMate Express™ enabled the best results. However AutoMate Express™ allowed the recovery of more DNA quantity and can remove more efficiently PCR inhibitors such as humic acids, which can be supported by the decrease of IPC values.

New and better extraction methods arise every day. It is essential to continue seeking for new methods of DNA extraction and purification as well as to improve the existing ones, in order to recover even the smallest amount of DNA present in degraded samples with PCR inhibitors present, enabling their genetic identification.

Conflict of interest

None.

References

- [1] J.M. Willard, D.A. Lee, M.M. Holland, A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, *J. Forensic Sci.* 55 (1) (2010) 25–33.
- [2] P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi, Chelex 100 as a medium for a simple extraction of DNA for PCR-based typing from a forensic material, *Biotechniques* 10 (1991) 506–513.
- [3] M. Bourke, C. Scherzinger, C. Ladd, et al., NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase, *J. Forensic Sci.* 44 (5) (1999) 1046–1050.

7.4. Anexo IV – Artigo aceite para publicação

Australian Journal of Forensic Sciences



Methods enhancement for improved recovery of human DNA from forensic blood samples on different fabrics using the DNA IQ System

Journal:	<i>Australian Journal of Forensic Sciences</i>
Manuscript ID:	TAJF-2013-0060.R2
Manuscript Type:	Original Paper
Keywords:	Degraded DNA, DNA extraction, DNA IQ™ system, Low amount DNA

SCHOLARONE™
Manuscripts

Abstract

DNA typing of biological samples can be a challenging task due to the presence of small amounts of DNA and/or a high content of PCR inhibitors. Our aim is to develop a protocol to recover DNA suitable for DNA typing from blood stained fabrics based on the DNA IQ™ System. Blood stains on different fabrics were buried in different types of soil and left for 1-7 days. The samples were then recovered and DNA was extracted with a modified DNA IQ™ System protocol, involving a modification in the preparation of the Wash Buffer. The samples extracted with the modified protocol showed a higher amount of recovered DNA compared to the recommended protocol. The removal of isopropanol from the Wash Buffer composition contributes to a higher amount of recovered DNA.

Keywords: Degraded DNA; DNA extraction; DNA IQ™ system; Low amount DNA

Introduction

DNA analysis for human identification is one of the great advances of modern genetics. It is a very useful methodology in helping to identify individuals that were present at a crime scene. Forensic scientists often deal with biological samples which have often undergone degradation due to harsh environmental conditions. In fact, one of the main challenges of forensic science is to be able to recover DNA from extensively degraded samples. UV light, heat, microbial degradation and the presence of inhibitors, are the major factors which interfere with the integrity of DNA and difficult the analysis of a biological sample.

For a successful DNA typing it is important to have sufficient amount of DNA template and the absence of PCR inhibitors in the sample. The procedures to be used vary depending on the type of biological sample and the type of support in which it was found. DNA extraction is the procedure by which DNA molecules are separated from all the other cell components. The resulting DNA solution can then be tested for quantity and quality of the DNA and subsequently be used in DNA template-based applications such as PCR. A good DNA extraction method should yield a high quality DNA and efficiently remove any contaminants that might otherwise interfere with subsequent enzymatic reactions.

Buffers containing different alcohols (i.e. ethanol and isopropanol) are widely used for the extraction, isolation and purification of DNA. Nucleic acids are released in the solution once the cells are lysed and polar water molecules rapidly surround the DNA molecules, promoting its solubility. The positively charged dipoles of water interact strongly with the negative charges on the phosphodiester groups of DNA, forming hydrogen bonds. Ethanol and isopropanol are completely miscible in water but they are far less polar than water. They have lower dielectric constants than water which means that their ability to shield positive and negative charges in solution and keep them segregated is much poorer. DNA is negatively charged and so is attracted to positive ions in the solution [1]. Once in solution, these alcohols will form hydrogen bonds with water molecules decreasing the number of water molecules available to hydrate the

DNA. This promotes the interaction of DNA with positive ions in the solution and causes it to precipitate. Isopropanol is more hydrophobic than ethanol inducing a faster precipitation of DNA with a lower alcohol concentration. Addition of salts to DNA in solution facilitates the precipitation because it promotes changes in the degree of charge neutralization of the DNA phosphates, inducing extensive changes in the hydrodynamic properties of the whole DNA molecule [2]. The presence of an alcohol in solution alters the DNA structure causing its unfolding and rearrangement to a more thermodynamically stable structure, which then precipitates. If there are any inhibitors attached to the DNA molecules or present in solution, these will be exposed during the DNA precipitation and therefore easily washed away. Since isopropanol is more hydrophobic than ethanol it will induce a faster precipitation and the DNA molecule will fold in a structure that is more condensed. The removal of contaminants might therefore be more difficult if isopropanol is used instead of ethanol [1].

Time-consuming techniques, the inability to remove PCR inhibitors, such as humic acids which are present in sand, clay and marshy soil, as well as the many steps and multiple tube transfers all increase the probability of either exogenous DNA contamination or low DNA yield. These constitute major burdens to an efficient criminal investigation [3].

The organic extraction method is the method of choice for "difficult" forensic casework samples. Despite being the reference extraction method to be used with these kind of samples, some studies have shown that although it yields moderate DNA, it is not the best method for the removal of PCR inhibitors [4]. Also, it involves the use of hazardous chemicals and requires the sample to be transferred between multiple tubes. Chelex is an alternative method that is widely used and allows the recovery of moderate amount of DNA. It is simple, fast and economic but is inefficient at removing some PCR inhibitors [3, 5, 6, 7, 8]. The ideal procedure for DNA extraction should be non-toxic, fast and economic and reliably recover high amounts of highly pure DNA from various types of samples. However, there is no "universal" DNA extraction procedure.

The DNA IQ™ System kit (Promega) is one of the favored methods for DNA extraction of samples containing PCR inhibitors and other contaminants. This kit uses technology that allows the purification and recovery of biological samples with low amounts of DNA and the presence of PCR inhibitors. A series of studies has been conducted to validate this extraction method for a variety of biological samples such as hair, saliva extracted from envelope flaps, buccal swabs, blood, among others [9, 10, 11, 12]. The technology is based on the strong affinity of DNA molecules for silica particles which are ferro-magnetic material incorporated into a silica gel matrix. Paramagnetic resin and resin-DNA conjugates can then be isolated in the presence of a magnetic stand. This system was designed to rapidly purify small amounts of DNA using less toxic reagents and gives consistent results for a given sample type [7]. Cells are initially lysed with a Lysis Buffer and cellular contents are released in the solution. The buffer contains a high

concentration of chaotropic salts which promote the breakdown of hydrogen bonds between DNA and water making the DNA more thermodynamically stable. The pH of the solution is acidic and therefore DNA molecules bind reversibly to magnetic particles. A magnetic stand is used to hold the resin-DNA conjugates to one side of the tube and any contaminants can then be easily washed away. In the final step a buffer with a high pH is used which causes the uncoupling of the resin-DNA conjugates.

Genetic identification of biological samples on different types of fabric with limited amount of DNA, often subjected to detrimental conditions and with the presence of inhibitors is an ongoing challenge. The most adequate extraction technique for the study of forensic samples may vary depending on the type of sample and the conditions it was subjected.

For this study bloodstains were made in three different types of fabrics (denim, cotton and lycra) and forensic samples identical to those found at crime scenes were simulated. These fabrics were chosen because they are the fabrics which frequently appear in forensic casework investigations. The bloodstains were placed in different environmental conditions - buried in three different types of soil (sand, marsh and clay) and at the soil surface in a forest in different seasons during 7 days in order to promote their natural degradation. These environments were chosen taking into account the various crime scenes where biological samples are often found. This paper describes an optimization of the DNA IQ™ protocol (involving a modification in the preparation of the Wash Buffer) for the extraction of DNA from degraded blood stain samples on different fabrics and in the presence of various types of inhibitors.

Materials and methods

Sample preparation

Thirty-nine blood stains approximately 50mm² wide were prepared from 30µl of blood from three male donors on different types of fabrics (denim, cotton and lycra). Twenty-seven samples were buried in three different types of soil (sand, marsh and clay) or left on a forest ground. The blood stains were collected after 1, 3 or 7 days and then used for protocol optimization.

To test for the reproducibility of the optimized assay, twelve blood stains were prepared from the same donor (donor c) and conserved at room temperature in the laboratory until use.

DNA extraction

Each blood stain was cut into small pieces and lysed with the prepared Lysis Buffer (for every 100µl Lysis Buffer add 1µl of 1M DTT) in a 2mL microcentrifuge tube for 30 min at 70°C, according to the manufacturer's protocol [13]. Different volumes of Lysis Buffer were used, depending on the type of fabric (300µl for cotton and lycra and 600µl for denim). Samples were then processed according to the Promega protocol [13] and a modified Promega protocol where the Wash Buffer was prepared with 15ml of ethanol instead of the recommended 15ml of ethanol and 15ml of isopropanol. A volume of 7µl of resin suspension and 30µl of elution buffer

was used per sample of the protocol optimization. For the reproducibility study, the same volume of resin suspension but 50µl of elution buffer was used for each sample.

DNA quantification

DNA was quantified with *Quantifiler™ Human DNA Quantification kit* (Applied Biosystems). The quantification assay was performed in the total volume of 13 µL, containing 1 µL of DNA extract, Quantifiler human primer mix, and Quantifiler PCR reaction using an ABI Prism® 7000, real-time PCR, with 0.5µl of BSA (Bovine Serum Albumin) [0.3%].

Quantification standard dilutions were made by serially diluting the 200 ng/µL stock solution from the kit to the following concentrations: 50, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068, 0.023 and 0.0076 ng/µL in TE Buffer (10mMTris-Cl pH 8.0, 0.1 mM Na₂EDTA) that contained 20 µg/mL of molecular biology grade glycogen as a stabilizer.

STR Analysis

The DNA extracts obtained from the blood stains using the DNA IQ™ modified protocol were amplified with the AmpFtSTR® Identifier™ (Applied Biosystems) and AmpFtSTR® Minifiler™ (Applied Biosystems) using the procedure described in the manufacturer's instructions. The amplified products were analyzed on a 3130 and 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) using GeneMapper ID v3.2 and GeneMapper® ID-X Software.

Reproducibility Study

To evaluate the reproducibility of the modified protocol, DNA was extracted using both DNA IQ™ System protocols with twelve stains from the same donor. For each fabric a set of 4 stains with different volumes of blood were used, 30, 15, 7.5 and 3.75µl. The extraction of DNA was performed on three different days. Each extraction set contained extraction blanks.

Statistical tests

A Wilcoxon Signed-Rank Test was carried out with SPSS software to assess whether the average quantity of DNA recovered using the modified DNA IQ™ protocol was significantly different from the quantity obtained using the manufacturer's protocol, for the degraded samples. For the reproducibility study a paired t-test was performed. A p-value of <0.001 was considered to be significant.

Results

Quantification

The amount of DNA retrieved, in ng/μl, is shown in the Table 1.

The amount of DNA recovered with the modified protocol was significantly higher than for the manufacturer's protocol, independently of the detrimental condition to which they were subjected and the fabric support. Ct values of the Internal PCR Control (IPC) were higher in the manufacturer protocol than in the modified protocol. Wilcoxon Signed-Rank Test indicated that there was a significant difference between the amount of DNA recovered from samples extracted with the modified protocol when compared with the manufacturer's protocol ($p < 0.001$, $z = -4.541$, $n=27$).

STR Analysis

The quality of isolated DNA using the modified protocol for DNA IQ™ System Kit was further verified by the STR profiles generated using the AmpFtSTR® Minifiler™ and AmpFtSTR® IdentiFiler™. The profiles obtained for three different samples are presented in Figures 1–2.

The STR profiles from the samples subject to detrimental conditions were complete and with concordant alleles when compared to the respective reference samples.

The data present in Table 1 demonstrates that the modified protocol for DNA IQ™ System is effective in isolating high-quality DNA from biological samples that are commonly observed in forensic casework, particularly when analyzing sample 14 which when extracted with the standard protocol the amount of nuclear DNA obtained (0 ng/μl) did not allow any amplification of STRs markers, while when extracted with the modified protocol yielded sufficient nuclear DNA (0.0315 ng/μl) for its amplification with AmpFtSTR® Minifiler™ kit. For the sample 17 when it was extracted with the standard protocol the amount of nuclear DNA obtained (0.0230 ng/μl) was only sufficient for its amplification with AmpFtSTR® Minifiler™ kit, whereas when extracted by the modified protocol it enabled the recovery of enough nuclear DNA (1.0926 ng/μl) for its amplification with AmpFtSTR® IdentiFiler™.

Reproducibility Study

A set of twelve blood stains were extracted using the DNA IQ™ System kit on three different days to assess the reproducibility of the extraction efficiency. DNA concentrations in the extracts, mean, and standard deviation values for the concentration of DNA are presented in Tables 2 and 3. DNA concentrations in the extracts for each sample, in the same conditions, were reproducible when the extractions were performed on three different days. The quantity of DNA varied along the different extractions, as a result of the variations in the biological contents of the samples, extraction and quantification procedures. The standard deviation values for the DNA yields from different samples studied ranged between 0.1011 and 1.3006 for the modified protocol and between 0.0637 and 0.5986 for the standard protocol. Paired-samples T test

indicated no statistically significant difference between the samples extracted with both protocols ($p=0.468$, $n=12$).

Discussion

The DNA IQ™ System is a DNA extraction and purification kit designed for forensic and paternity tests. This system uses a paramagnetic resin which has high affinity for DNA and enables the isolation of clean DNA for use with short tandem repeat (STR) analysis [12].

Washing is a critical step in the protocol recommended by the DNA IQ™ System. The use of isopropanol and ethanol together in this step forces the DNA to undergo a structural change, releasing inhibitors before the DNA purification. When DNA undergoes this rearrangement, electrostatic bonds between the resin and DNA are broken. This promotes the unbinding of DNA from the resin. By having no time to rebind, this will result in a DNA loss during the washes. Removing isopropanol from the Wash Buffer, results in less DNA structural adaptation, less electrostatic bonds breaking, inhibitors being effectively eliminated and the loss of DNA is minimized [1], [14].

Several washes with Promega Wash Buffer are made. In this step, the removal of PCR inhibitors should be maximized at the same time as the loss of DNA minimized. For all the samples processed in this study, the average total DNA yields from the DNA IQ™ with the modified (1.2726 ng/μl) and standard (0.3895 ng/μl) protocols were significantly different ($p < 0.001$) and the modified protocol enabled a higher recovery of DNA.

The Internal PCR Control (IPC) is a template DNA which is added to the reaction with a fixed concentration, the Ct value should be relatively stable if no inhibition occurs [15]. Because the IPC values were lower (28.41) for the modified protocol than those verified for the standard protocol (30.36), indicates that the inhibitors were more efficiently removed during the wash step.

For the samples used for the reproducibility study, the average total DNA yields from both protocols were not significantly different ($p > 0.001$), probably because these samples have high amount of DNA and few inhibitors present (e.g. indigo dye).

Conclusion

The removal of isopropanol from the wash buffer in the DNA IQ™ System kit results in an effective elimination of inhibitors and a minimal loss of DNA during the wash step, probably because it results in a minor DNA structural adaptation.

The improvement of this extraction kit for the application to minute amount DNA samples and / or with the presence of inhibitors is of major importance for the forensic community.

Table 1 – Quantification results of the different samples extracted with the standard protocol (1) and with the modified protocol (2). IPC – Internal PCR Control values: Und – undetermined; normal <30; SD – Standard Deviation; Ct – Threshold cycle. Positive control (0.1ng/μl) CT value - 31.94; Amount of DNA (ng/μl) – 0.1646 and IPC value – 27.56; Negative control CT value – und and IPC value – 27.54.

Table 2 – Results of the reproducibility study with modified protocol. Positive control (0.1ng/μl) CT value - 32.17; Amount of DNA (ng/μl) – 0.1378 and IPC value – 28.69; Negative control CT value – und and IPC value – 28.70.

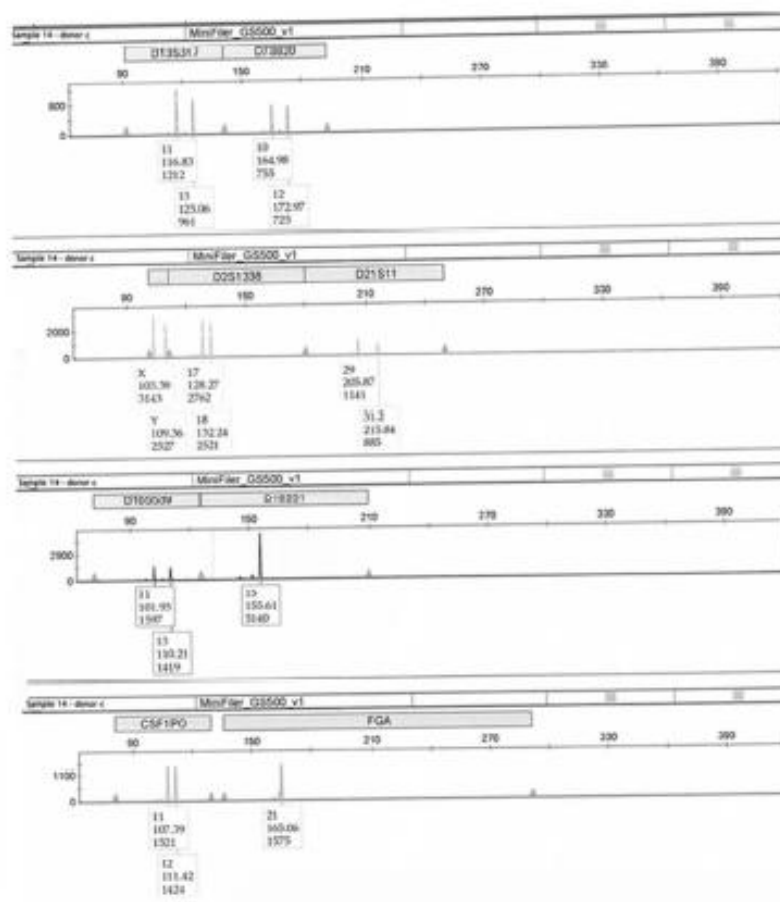
Table 3 – Results of the reproducibility study with original protocol. Positive control (0.1ng/μl) CT value - 32.17; Amount of DNA (ng/μl) – 0.1378 and IPC value – 28.69; Negative control CT value – und and IPC value – 28.70.

Figure 1 – Electropherogram of blood sample 14 (Table 1) extracted with the modified protocol of DNA IQ™ System kit, amplified with AmpFtSTR® MiniFiler™ and analyzed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using GeneMapper® ID v3.2 Software, according to manufacturer's instructions.

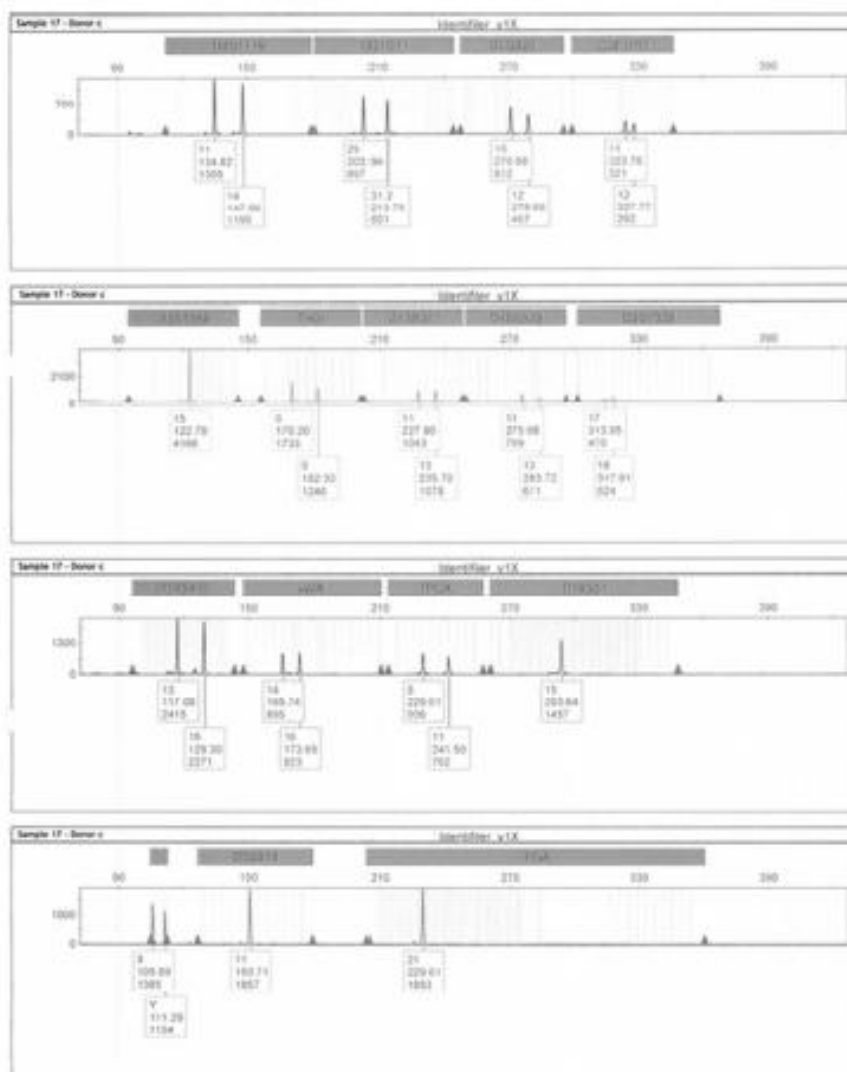
Figure 2 – Electropherogram of blood sample 17 (Table 1) extracted with the modified protocol of DNA IQ™ System kit, amplified with AmpFtSTR® IdentiFiler™ and analyzed on a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using GeneMapper® ID-X Software, according to manufacturer's instructions.

Sample	Detrital condition	Donor	Fabric	CT ¹	Standard Protocol		CT ²	Modified Protocol	
					Amount of DNA (ng/μl) ¹			Amount of DNA (ng/μl) ²	
1	Marshy soil - 1 day	a	Denim	und	0	30.99	37.56	0.0021	28.37
2	Marshy soil - 1 day	a	Lycra	und	0	31.13	30.03	0.0002	29.27
3	Marshy soil - 1 day	b	Denim	und	0	31.04	34.45	0.0237	27.99
4	Marshy soil - 1 day	b	Lycra	37.97	0.0016	30.53	37.37	0.0025	28.49
5	Marshy soil - 1 day	b	Cotton	und	0	30.63	36.05	0.0069	28.37
6	Marshy soil - 1 day	c	Cotton	und	0	32.81	36.34	0.0129	28.14
7	Clay soil - 1 day	a	Denim	38.22	0.0013	30.77	34.82	0.0178	29.58
8	Clay soil - 1 day	a	Lycra	und	0	30.56	36.73	0.0041	29.21
9	Clay soil - 1 day	b	Cotton	37.27	0.0027	30.30	32.64	0.0669	29.85
10	Clay soil - 1 day	a	Cotton	36.61	0.0045	30.13	30.70	0.1347	29.81
11	Clay soil - 1 day	c	Lycra	und	0	29.88	36.38	0.0053	29.46
12	Sandy soil - 1 day	b	Lycra	30.56	0.4781	30.00	28.90	1.7235	30.20
13	Sandy soil - 1 day	b	Denim	29.76	0.8869	30.23	29.02	1.5709	29.93
14	Clay soil - 1 day	c	Cotton	und	0	30.63	34.08	0.0315	29.72
15	Soil surface - 1 day	a	Denim	32.44	0.1119	30.18	28.37	2.5956	27.01
16	Sandy soil - 7 days	c	Lycra	und	0	29.97	35.14	0.0139	29.72
17	Sandy soil - 1 day	c	Denim	34.49	0.0230	29.61	29.49	1.0826	29.44
18	Soil surface - 1 day	a	Lycra	29.40	1.1713	29.56	28.37	2.5956	26.96
19	Soil surface - 1 day	b	Lycra	29.21	1.3565	30.47	28.66	2.0746	27.09
20	Soil surface - 1 day	c	Lycra	28.62	2.1396	29.84	28.28	2.7825	27.04
21	Soil surface - 3 days	b	Lycra	29.88	0.8084	30.04	28.98	1.6202	27.03
22	Sandy soil - 3 days	b	Cotton	28.57	2.2240	29.92	27.24	6.2139	26.44
23	Sandy soil - 3 days	c	Cotton	32.74	0.0887	30.20	26.69	9.5037	26.91
24	Clay soil - 3 day	b	Denim	37.42	0.0024	30.44	33.46	0.0509	28.54
25	Sandy soil - 3 days	a	Denim	29.37	1.1968	30.22	28.87	1.7640	27.06
26	Sandy soil - 3 days	c	Lycra	36.05	0.0069	29.91	34.12	0.0306	26.90
27	Sandy soil - 7 days	b	Lycra	35.86	0.0393	29.86	30.85	0.3821	28.48
Mean					0.3895	30.36		1.2726	28.41
SD					0.6728	0.64		2.1775	1.21

Quantification results of the different samples extracted with the standard protocol (1) and with the modified protocol (2). IPC – Internal PCR Control values: Und – undetermined; normal <30; SD – Standard Deviation; Ct – Threshold cycle. Positive control (0.1ng/μl) CT value – 31.94; Amount of DNA (ng/μl) – 0.1646 and IPC value – 27.56; Negative control CT value – und and IPC value – 27.54.
58x47mm (300 x 300 DPI)



Electropherogram of blood sample 14
25x31mm (600 x 600 DPI)



Electropherogram of blood sample 17
25x31mm (600 x 600 DPI)

Modified Protocol									
Sample	Day 1			Day 2			Day 3		
	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC
Denim 30μl	30.70	0.1050	28.43	29.38	1.1885	28.38	29.55	1.0431	28.15
Denim 15μl	31.01	0.3377	28.74	30.23	0.6189	28.43	29.85	0.8274	28.62
Denim 7.5μl	30.50	0.5007	28.62	30.77	0.4065	28.75	30.20	0.6313	28.39
Denim 3.75μl	31.00	0.3403	28.95	31.23	0.2849	28.95	30.02	0.7255	28.38
Lycra 30μl	29.82	1.0706	28.70	28.99	1.0641	28.40	29.32	1.0406	28.05
Lycra 15μl	27.79	4.0629	28.63	28.99	1.6078	28.02	28.65	2.0907	28.25
Lycra 7.5μl	28.95	2.2586	28.52	28.98	1.6262	28.40	28.71	1.9980	27.93
Lycra 3.75μl	29.85	0.8274	28.94	29.24	1.3254	28.60	29.29	1.2752	28.12
Cotton 30μl	29.40	0.9545	29.37	29.90	1.3651	28.70	30.11	0.6766	28.40
Cotton 15μl	37.03	0.0032	29.15	30.76	0.4033	28.76	30.20	0.6313	28.51
Cotton 7.5μl	31.50	0.2313	28.70	32.13	0.1421	29.20	30.79	0.4002	28.41
Cotton 3.75μl	31.09	0.3174	29.20	32.33	0.1218	29.00	31.33	0.2637	27.77
								Mean	Standard Deviation
								Amount of DNA (ng/μl)	DNA

Results of the reproducibility study with modified protocol; Positive control (0.1ng/μl) CT value - 32.17; Amount of DNA (ng/μl) - 0.1378 and IPC value - 28.69; Negative control CT value - und and IPC value - 28.70.

105x38mm (300 x 300 DPI)

Original Protocol									
Sample	Day 1			Day 2			Day 3		
	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC	CT	Amount of DNA (ng/μl)	IPC
Denim 30μl	29.20	1.3051	28.54	29.37	1.1900	28.44	29.00	0.6210	28.20
Denim 15μl	29.25	1.3152	28.20	29.62	0.9882	28.09	29.75	0.8938	27.99
Denim 7.5μl	29.44	1.1357	28.23	29.44	1.1357	27.78	30.08	0.7089	27.90
Denim 3.75μl	30.12	0.6716	28.46	30.44	0.5245	28.30	31.14	0.3054	28.48
Lycra 30μl	29.60	1.4090	28.46	28.02	2.1090	28.17	29.60	0.9405	28.50
Lycra 15μl	29.09	1.4882	28.13	28.54	1.0512	27.96	30.16	0.6512	27.99
Lycra 7.5μl	29.91	0.7899	28.3	30.10	0.6820	28.36	30.24	0.6121	27.91
Lycra 3.75μl	29.01	1.5631	27.81	30.00	0.7369	28.24	30.36	0.5579	28.21
Cotton 30μl	29.97	0.7541	28.55	29.71	0.9219	28.55	29.73	0.9077	28.42
Cotton 15μl	29.75	0.8638	28.06	30.64	0.4494	28.04	30.22	0.6217	28.16
Cotton 7.5μl	30.50	0.3676	28.29	31.06	0.3249	28.27	31.44	0.2422	28.26
Cotton 3.75μl	31.94	0.1646	28.84	30.87	0.3762	28.18	31.14	0.3054	28.21
								Mean	Standard Deviation
								Amount of DNA (ng/μl)	DNA

Results of the reproducibility study with original protocol; Positive control (0.1ng/μl) CT value - 32.17; Amount of DNA (ng/μl) - 0.1378 and IPC value - 28.69; Negative control CT value - und and IPC value - 28.70.

104x40mm (300 x 300 DPI)

References

- [1] D. L. Nelson; M. M. Cox, Lehninger – Principal of Biochemistry, 5th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 2008, pp. 43 – 152
- [2] S. Surzycki, Human Molecular Biology Laboratory Manual, 1st ed., Wiley-Blackwell, Oxford, 2003, pp. 1 - 19
- [3]. J. M. Willard, D. A. Lee, M. M. Holland, Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin, Forensic DNA Profiling Protocols: Methods in Molecular Biology™, Human Press, NJ, 98 (1998), pp. 9-18
- [4]. J. Davoren, D. Vanek, R. Konjodžić, J. Crews, E. Huffine, T. J. Parsons, Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves, Croat Med J., 48 (2007), pp. 478-85
- [5]. P.S Walsh, D.A Metzger, R. Higuchi, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, Biotechniques, 10 (4) (1991), pp. 506-13
- [6]. W. Bär, A. Kratzer, M. Maechler, W. Schmid, Postmortem stability of DNA, Forensic Science International, 39 (1988), pp. 59 – 70
- [7]. D.K. Lahiri, S. Bye, J.I. Jr Nurnberger, M.E. Hodes, M. Crisp, A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested, J Biochem Biophys Methods, 25 (4) (1992) pp. 193-205
- [8]. S. A. Greenspoon; M.A. Scarpetta, M. L. Drayton, S. A. Turek, QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for Forensic casework, J. Forensic Sci., 43 (5) (1998), pp. 1024-30
- [9]. L. A. Schiffner, E. J. Bajda, M. Prinz, J. Sebestyen, R. Shaler, T. A. Caragine, Optimization of a Simple, Automatable Extraction Method to Recover Sufficient DNA from Low Copy Number DNA Samples for Generation of Short Tandem Repeat Profiles, Croat. Med. J., 46(4), (2005), pp. 578-586
- [10]. L.Ng, A.Ng, F. Cholette, C. Davis, Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQ™ System for STR genotyping, Forensic Science International: Genetics, 1 (2007) pp. 283–286
- [11]. H. Poon, J. Elliott, J. Modler, C. Frégeau, The use of Hemastix and the subsequent lack of DNA recovery using the Promega DNA IQ system, J Forensic Sci. 54(6), (2009), pp.1278-86

- 1
2
3 [12]. P.V. Mandrekar, B.E. Krenke and A. Tereba, *DNA IQ™ - The intelligent way to purify DNA*,
4 *Profiles in DNA*, 4 (3) (2001), pp. 16.
5
6
7 [13]. Promega Technical Bulletin. *DNA IQ System – Small Sample Casework Protocol*. Rev.
8 04/06, Promega Corporation
9
10
11 [14]. V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties, and*
12 *Functions*, University Science Books, Sausalito, 2000, pp. 725 – 765
13
14
15 [15]. U. Ricci, C. Marchi, C. Previderè, P. Fattorini, *Quantification of human DNA by real-time*
16 *PCR in forensic casework*, International Congress Series 1288 (2006), pp.750 – 752
17
18
19
20
21

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **FACULDADE DE DIREITO**
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **FACULDADE DE FARMÁCIA**
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA**
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **FACULDADE DE PSICOLOGIA
E DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO**
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR**
UNIVERSIDADE DO PORTO

